

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität  
Marburg

Leiter: Prof. Dr. A. Hasilik

**Transport und Modifizierung lysosomaler Enzyme  
in Mukopolidose II / III - Zellen**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten  
Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Claudio Schwab  
aus Ulm

Marburg 1998

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 15.10.1998

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Hasilik

Korreferent: Prof. Dr. Fuhrmann

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Einführung	1
1.2. Transport und Prozessierung lysosomaler Enzyme	2
1.2.1. N-Glykosylierung im ER und Golgi-Kompartiment	2
1.2.2. Phosphorylierung lysosomaler Enzyme	4
1.2.3. Vesikeltransport und Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren	6
1.2.4. Proteolytische Prozessierung lysosomaler Enzyme	8
1.2.5. Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport	8
1.3. Cathepsin D	10
1.4. Mukopolidosen	12
1.5. Fragestellung	14
<b>2. Materialien und Methoden</b>	17
2.1. Materialien für Labor und Gewebekultur	17
2.1.1. Laborgeräte	17
2.1.2. Enzyme	18
2.1.3. Antikörper	18
2.1.4. Radiochemikalien	18
2.1.5. Laborchemikalien	18
2.1.6. Eukaryonte Zelllinien	20
2.1.7. Medien und Waschlösungen	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur	21
2.2.1.1. Aussaat der Zellen	22
2.2.1.2. Zellzählung	22
2.2.2. Metabolische Markierung	22
2.2.2.1. Ernten der markierten Zellen und Medien	23
2.2.2.2. Immunpräzipitation von Cathepsin D aus Zellhomogenat und Medien	24
2.2.2.3. Messen der Einbauraten mittels Szintillationszähler	24
2.2.2.4. Konjugation von Antikörpern an Staph-A-Zellwandextrakt	24
2.2.2.5. Lösen der Immunkomplexe	25
2.2.3. Behandlung von Immunpräzipitaten mit Endoglycosidase H	25
2.2.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	26
2.2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gel	27
2.2.4.2. Auswertung der SDS-PAGE mittels Phospho-Imager	27
2.2.4.3. Vorbereitung der Gele für die Fluorographie	28
2.3. Gewinnung von Zellextrakt	28
2.4. Enzymassays	29
<b>3. Ergebnisse</b>	30
3.1.1. Zellgrößenverteilungen	30
3.1.2. Wachstumsverlauf kultivierter Testzellen	31
3.2. Metabolische Markierungen in An- und Abwesenheit von $\text{NH}_4\text{Cl}$	33
3.2.1. Sortierung von Cathepsin D bei Kontrollfibroblasten	34

3.2.2. Sortierung von Cathepsin D bei BIC-Fibroblasten.....	35
3.2.3. Sortierung von Cathepsin D bei CAB-Fibroblasten.....	37
3.3. Pulse-Chase-Markierung der BIC Fibroblasten .....	38
3.4.1. Oligosaccharidanalysen.....	40
3.4.2. Phosphorylierung von Cathepsin D.....	44
3.5. Überblick: Cathepsin D-Sortierung.....	45
3.6. Enzymassays.....	46
3.6.1. Kontrollfibroblasten.....	47
3.6.2. BIC-Fibroblasten.....	47
3.6.3. CAB-Fibroblasten.....	47
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1. Fibroblasten der Zelllinie BIC.....	48
4.1.1. Diagnose und Differentialdiagnose.....	49
4.1.2. Mannose-6-Phosphat-unabhängige Segregation.....	50
4.2. Fibroblasten der Zelllinie CAB.....	52
4.2.1. Differentialdiagnose.....	52
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>6. Fotos.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
 <b>Verzeichnis der akademischen Lehrer.....</b>	 <b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>73</b>

## **1. Einleitung**

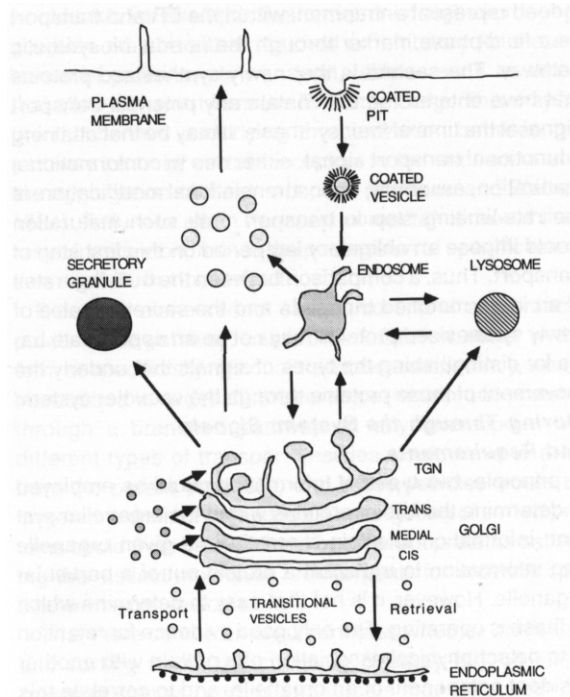
### **1.1. Einführung**

Lysosomen sind in der Mitte dieses Jahrhunderts entdeckt und von de Duve und Mitarbeitern als membranumschlossene Kompartimente eukaryonter Zellen beschrieben worden, in denen vornehmlich katabole Stoffwechselprozesse stattfinden (1966). Sie werden auch als terminal abbauendes Kompartiment bezeichnet (Kornfeld und Mellmann, 1989). Intralysosomal befindet sich eine Vielzahl verschiedener hydrolytischer Enzyme, wie z.B. Proteinasen, Nukleasen, Glykosidasen und Phospholipasen. Das für deren optimale Wirkung notwendige saure Milieu wird durch eine membranständige ATP-abhängige Protonen-Pumpe aufrecht erhalten (Forgac, 1992). Substrate gelangen entweder durch Endozytose mittels Endosomen, durch Autophagozytose zelleigener Bestandteile oder durch Phagozytose großer Partikel in die Lysosomen.

Die Mechanismen, die die Sortierung und Zielsteuerung von Proteinen nach ihrer Synthese vermitteln, sind noch weitgehend unerforscht. Eine Möglichkeit der Zielsteuerung lysosomaler Enzyme in Fibroblasten ist allerdings recht gut charakterisiert. Lösliche lysosomale Enzyme verfügen hierbei über ein spezifisches Erkennungssignal, einen an Zuckerseitenketten lysosomaler Enzymvorstufen gebundenen Mannose-6-Phosphat-Rest, der von einem spezifischen membranständigen Rezeptor gebunden wird (Übersicht: von Figura und Hasilik, 1986).

Es ist jedoch bekannt, daß Hepatozyten, Leukozyten und einige andere Zelltypen lysosomale Enzyme hauptsächlich Mannose-6-Phosphat (M-6-P)-unabhängig segregieren (Owada, Neufeld, 1982; Kornfeld, Sly, 1995). Ferner gibt es einige Hydrolasen, wie z.B. die  $\beta$ -Glucocerebrosidase, die generell ohne dieses Erkennungssignal in die Lysosomen transportiert werden (Aerts et al., 1988). Diese Beobachtungen sprechen für die Existenz eines alternativen, M-6-P-unabhängigen Transportweges für lysosomale Enzyme.

Einen Überblick über die membranumschlossenen Kompartimente eukaryonter Zellen gibt Abbildung 1:



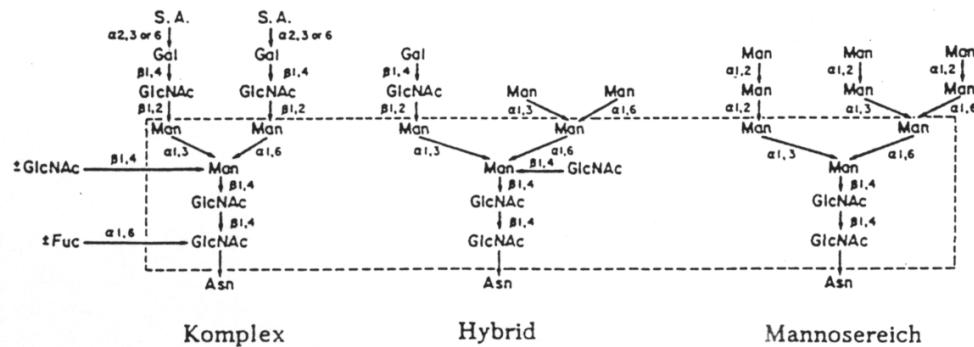
**Abbildung 1:** Aufbau des intrazellulären Membransystems (Klausner, 1989)

## 1.2. Transport und Prozessierung lysosomaler Enzyme

### 1.2.1. N-Glykosylierung im ER und Golgi-Kompartiment

Nach der Translokation lysosomaler Enzymvorstufen ins ER werden diese an selektiven Asparaginreste der Sequenz Asn-X-Ser/Thr N-glykosidisch gebunden. Dabei überträgt eine spezifische Oligosaccharyltransferase einen Oligosaccharidrest  $(\text{Glc})_3-(\text{Man})_9-(\text{GlcNAc})_2$ , der an den Carrier Dolicholpyrophosphat gebunden ist, auf den Asparaginrest. Anschließend wird der Oligosaccharidrest im ER und Golgi-Apparat modifiziert (*trimming*). Die dabei entstehenden Oligosaccharidseitenketten lassen sich prinzipiell in drei Hauptklassen einteilen: Eine 'komplexe', eine 'mannosereiche' und als Zwischenform eine 'hybride' Form. Alle enthalten eine gemeinsame Grundstruktur (Core), bestehend aus drei Mannose- und zwei GlcNAc-Resten (Kornfeld, Kornfeld, 1985). Die Modifikation verläuft streng nach Reihenfolge über eine Kaskade

enzymatischer Reaktionen, in deren Verlauf die Proteine den Golgi-Apparat von den Cis- über die Mid- zu den Trans-Golgi-Zisternen durchqueren.

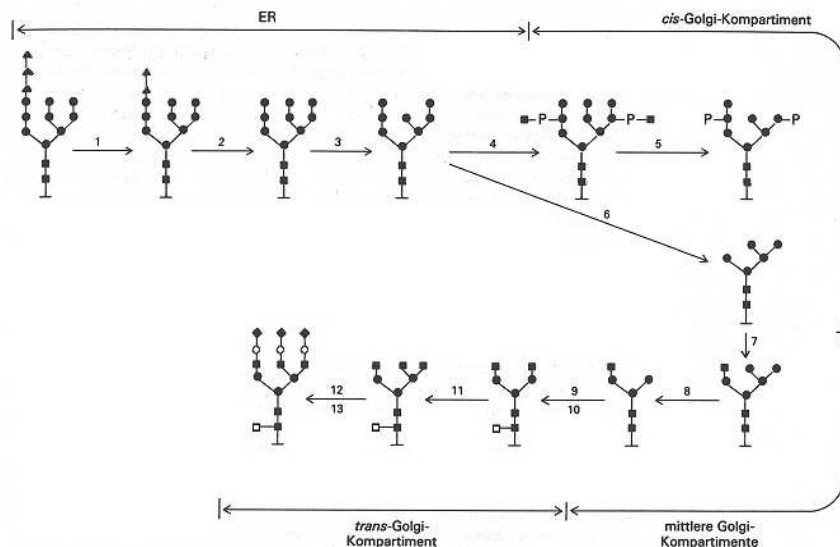


**Abbildung 2:** Asparagin-gekoppelte Oligosaccharide

Die Modifikation der Oligosaccharidseitenketten beginnt im ER mit der Abspaltung der Glucosereste durch die  $\alpha$  1, 2-spezifische Glucosidase I und die  $\alpha$  1, 3-spezifische Glucosidase II. Danach spaltet die  $\alpha$ -Mannosidase einen Mannose-Rest ab, woraufhin die Proteine über sogenannte *transitional elements* in den Golgi-Apparat transportiert werden (Farquhar und Palade, 1981).

Die Oligosaccharide der meisten Glykoproteine werden im weiteren Verlauf nach dem in Abbildung 3 demonstrierten Schema zur komplexen Endform modifiziert.

Lysosomale Enzyme haben nach Einwirkung der  $\alpha$ -Mannosidase im ER und Transport in den Golgi-Apparat jedoch nicht das gleiche Schicksal wie andere Glykoproteine. Sie unterliegen einer enzymatisch vermittelten Modifikation ihrer Oligosaccharidseitenketten, die deren weiteres *Trimming* zur komplexen Form verhindert (Hasilik und von Figura, 1981) und die es ihnen ermöglicht, den Transportweg sekretorischer Proteine zu verlassen.



**Abbildung 3:** Modifikationen n-glykosidisch gebundener Oligosaccharide (Kornfeld und Kornfeld, 1985)

1: Glucosidase I; 2: Glucosidase II; 3: ER-Mannosidase; 4: Phosphotransferase; 5: Phosphodiesterase; 6: Golgi-Mannosidase I; 7: GlcNAc-Transferase I; 8: Golgi-Mannosidase II; 9: GlcNAc-Transferase II; 10: Fucosyltransferase; 11: GlcNAc-Transferase IV; 12: Galactosyltransferase; 13: Sialyltransferase (Goldberg und Kornfeld, 1983).

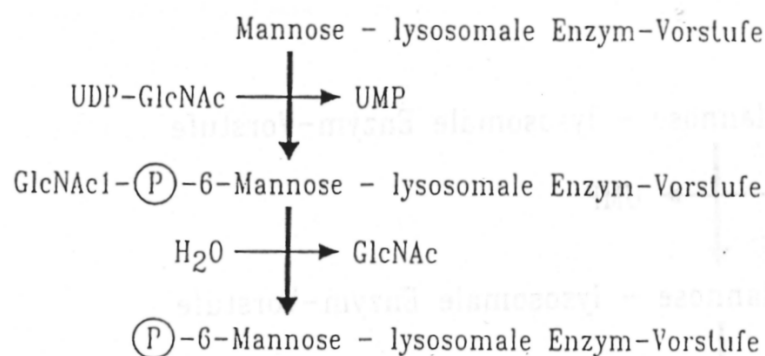
Symbole:  $\triangleright$  : Glucose;  $\square$  : Fucose;  $\bullet$  : GlcNAc;  $\lambda$  : Mannose;  $\circ$  : Galactose;  $\blacklozenge$  : Sialinsäure; P : Phosphat

### 1.2.2. Phosphorylierung lysosomaler Enzyme

Zur Segregation in die Lysosomen benötigen lysosomale Enzyme ein spezifisches Sortierungssignal. Bei den meisten löslichen lysosomalen Enzymen handelt es sich hierbei um einen an Zuckerseitenketten gebundenen Mannose-6-Phosphat-Rest, der im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) von einem spezifischen membranständigen Rezeptor gebunden wird. Die Synthese dieses Sortierungssignals wird durch zwei Enzyme katalysiert: durch die UDP-N-Acetylglucosamin - lysosomales Enzym - N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (EC 2.7.8.17), kurz GlcNAc-Phosphotransferase, und durch die N-Acetylglucosamin-1-Phosphodiester- $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase (EC 3.1.4.45), kurz Phosphodiester-glucosaminidase oder Phosphodiesterase (Übersicht: von Figura und Hasilik, 1986). Zuerst überträgt die GlcNAc-Phosphotransferase aus UDP-GlcNAc ein N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf die C-6-Hydroxylgruppe eines Mannose-Restes der Vorstufe des lysosomalen Enzyms (Reitmann und Kornfeld, 1981a,b; Waheed et al., 1982). Im nächsten Schritt spaltet die



Phosphodiesteroglucosaminidase den GlcNAc-Rest ab, wodurch das Phosphat als Mono-Ester freiliegt. Die Phosphodiesteroglucosaminidase wird demnach auch als '*uncovering enzyme*' bezeichnet. Nur wenn das Phosphat als Mono-Ester vorliegt, kann es vom M-6-P-Rezeptor erkannt werden (Varki und Kornfeld, 1981; Waheed et al., 1981). Anreicherung und Charakterisierung humaner GlcNAc-Phosphotransferase aus Lymphoblasten und boviner GlcNAc-Phosphotransferase aus Milchdrüsenzellen sind inzwischen durchgeführt (Zhao et al., 1992; Bao et al., 1996 a,b). Die Phosphodiesterase ist mittlerweile aus humanem Serum und aus Epstein-Barr-Virus-transformierten humanen Lymphoblasten hochangereichert und charakterisiert worden (Lee et al., 1995; Page et al., 1996).



**Abbildung 4:** Synthese des Mannose-6-Phosphat-Erkennungssignals

Lysosomale Enzyme besitzen auf ihrer Oberfläche eine spezifische dreidimensionale Erkennungsstruktur, aufgrund derer die GlcNAc-Phosphotransferase sie von anderen Glykoproteinen unterscheiden kann. An der Konformation dieser Determinanten sind die Aminosäuren 265-292 und Lys 203 beteiligt. (Von Figura, Hasilik, 1986; Baranski et al., 1990, 1991, 1992). Die GlcNAc-Phosphotransferase verfügt neben der Domäne für die katalytische Funktion noch über eine zur Erkennung lysosomaler Enzyme.

Noch nicht völlig geklärt ist die Lokalisation der GlcNAc-Phosphotransferase. Wahrscheinlich kommt ein Intermediärkompartiment, ein Organell im Prä-Golgi-Bereich als Sitz der GlcNAc-Phosphotransferase in Frage (Pelham, 1988; Hauri und Schweizer, 1992). Räumlich getrennt von der Phosphorylierung findet das *uncovering* der Phosphatreste im cis/mid-Golgi-Bereich statt (Schweizer et al., 1991; Mullis und Kornfeld, 1994; Radons et al., 1990).

### 1.2.3. Vesikeltransport und Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Proteine werden intrazellulär in membranumhüllten Vesikeln transportiert. Beim Transport vom ER zum Golgi-Kompartiment, sowie innerhalb der Golgi-Zisternen handelt es sich hierbei um nicht-clathrin-beschichtete Vesikel (Malhorta et al., 1989). Der Transport vom TGN zum prälysosomalen-endosomalen Kompartiment findet in clathrin-beschichteten Vesikeln statt (Pearse und Robinson, 1990). Auf der luminalen Seite des TGN binden integrale Membranproteine phosphorylierte lysosomale Enzyme. Dies ist der entscheidende Schritt bei der Sortierung lysosomaler Enzyme.

Es sind zwei unterschiedliche M-6-P-Rezeptoren (MPR) bekannt: Ein Kationen-abhängiger mit einem Molekulargewicht von 46 kDa (MPR 46), (Hoflack und Kornfeld, 1985; Stein et al., 1987a,b), und ein Kationen-unabhängiger mit einem Molekulargewicht von 275- 300 kDa (MPR 300), (Sahagian et al., 1981). Der MPR 300 hat außerdem noch eine Bindungsstelle für Insulin-Wachstumsfaktor und wird deshalb auch als M-6-P / IGF-Rezeptor bezeichnet (Dahms et al., 1994).

In vitro bindet der MPR 46 zwar eine Subpopulation der vom MPR 300 gebundenen Mannose-6-Phosphat-Glykoproteine mit meist jedoch geringerer Affinität (Sleat und Lobel, 1997), aber in vivo läßt sich der Ausfall keiner der beiden Rezeptoren hinreichend durch den anderen kompensieren (Pohlmann et al., 1995; Munier-Lehmann et al., 1996).

Beide Rezeptoren finden sich auch in der Plasmamembran (Stein et al., 1987a,b; Duncan und Kornfeld, 1989). Jedoch nur der MPR 300 ist in der Lage, M-6-P-haltige Liganden aus dem Extrazellulärraum zu binden (Stein et al., 1987a,b).

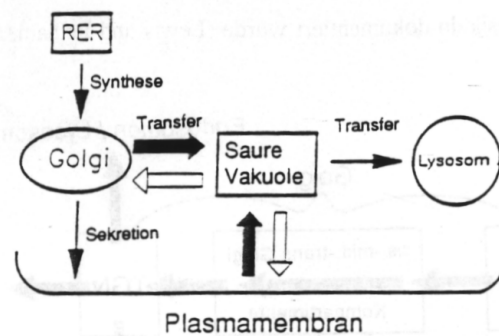
Die Bindungsfähigkeit beider Rezeptortypen ist bei einem pH von 6 bis 6,3 am größten. Unter einem pH von 6 kommt es zur Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes (Schmid et al., 1989, Hoflack et al., 1987). In reifen Lysosomen lassen sich keine M-6-P-Rezeptoren finden, also muß die Dissoziation in einem prälysosomalen, sauren Kompartiment erfolgen (Sahagian und Neufeld, 1983). Schwache Basen, wie  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , können saure Kompartimente alkalisieren, wodurch die Dissoziation der lysosomalen Enzymvorstufe vom Rezeptor im prälysosomalen Kompartiment und damit die

Segregation behindert wird (Kornfeld, 1992; von Figura, Hasilik, 1986). Folge ist eine gesteigerte Sekretion lysosomaler Enzymvorstufen (Braulke et al., 1987; Oude Elferink et al., 1985; Gonzalez-Noriega et al., 1980; Hasilik und Neufeld, 1980a).

Der Transport vom prälysosomalen Kompartiment zum reifen Lysosom ist noch nicht geklärt. Es könnte sich dabei um einen Vesikeltransport oder auch um einen graduellen Übergang vom Prälysosom zum reifen Lysosom handeln (Von Figura und Hasilik, 1986; Smith und Warren, 1991). M-6-P-Rezeptoren kehren nach der Dissoziation des Liganden entweder in clathrin-beschichteten Vesikeln zum TGN zurück, wo sie der erneuten Kopplung an ein phosphoryliertes Oligosaccharid zur Verfügung stehen, oder sie zirkulieren zwischen TGN und Plasmamembran (Achkar et al., 1990).

Die Segregation lysosomaler Enzyme verläuft offenbar nicht vollständig, so daß ca. 5-20 % der lysosomalen Enzymvorstufen physiologisch sezerniert werden. Sie tragen vornehmlich komplexe Oligosaccharidseitenketten, können aber auch phosphoryliert sein (Hasilik und Neufeld, 1980; Kornfeld, 1986). Über den MPR-300 können sie jedoch wieder in die Zelle aufgenommen und normal prozessiert werden (Hanewinkel et al., 1987). Möglicherweise sind für Ab- und Umbauvorgänge extrazellulärer Matrix im Knochen- und Bindegewebe sezernierte lysosomale Enzyme notwendig (Kornfeld und Mellmann, 1989; von Figura und Hasilik, 1986). Osteoklasten scheinen einen solchen Mechanismus zu benutzen (Baron, 1989). Die Sekretion lysosomaler Enzyme bzw. deren Vorstufen sind unter anderem an Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen, Hepatozyten und Monozyten beobachtet worden (Hasilik et al. 1981; Kelly und Carchmann, 1987; Tapper und Sandler, 1990; Imort et al., 1983).

Einen Überblick über den Transport lysosomaler Enzyme und das Schicksal von M-6-P-Rezeptoren gibt Abbildung 5.



**Abbildung 5:** Transportwege lysosomaler Enzyme und Recycling der M-6-P-Rezeptoren

Die dünnen Pfeile zeigen den nicht-rezeptorvermittelten Transport, die dicken ausgefüllten Pfeile den rezeptorvermittelten und die hohlen Pfeile das Recycling der M-6-P-Rezeptoren (Achkar et al., 1990).

#### 1.2.4. Proteolytische Prozessierung lysosomaler Enzyme

Die verschiedenen Modifizierungsschritte, denen lysosomale Enzyme auf ihrem Weg vom ER zum Lysosom unterworfen sind, können in eine frühe und eine späte Prozessierung unterteilt werden. Die frühe Prozessierung ist charakterisiert durch Modifikationen an den Zuckerseitenketten (wie bereits oben beschrieben), während die späte Prozessierung lysosomaler Enzyme hauptsächlich aus der proteolytischen Fragmentierung ihrer Polypeptidketten besteht. Lysosomale Enzyme werden in der Regel als inaktive Pro-Enzyme synthetisiert. Die Fragmentierung findet erst nach der Dissoziation der lysosomalen Enzymvorstufe vom Rezeptor statt (Übersicht: Hasilik, 1992).

Die Fragmentierung der lysosomalen Enzymvorstufe wird weiter unten anhand des löslichen lysosomalen Enzyms Cathepsin D dargestellt.

#### 1.2.5. Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport

Die Zielsteuerung der meisten löslichen lysosomalen Enzyme erfolgt, wie oben beschrieben, über die Bindung des M-6-P-Erkennungssignals an spezifische Rezeptoren. Es gibt jedoch einige Hinweise für die Existenz eines M-6-P-unabhängigen Segregationsweges. In Fibroblasten von Mukopolidose-Patienten (Siehe Kapitel 1.4.)

werden lysosomale Enzyme aufgrund eines Defektes der GlcNAc-Phosphotransferase nicht mit dem Erkennungssignal versehen und deshalb verstärkt sezerniert. Einige andere Zelltypen, wie z.B. Hepatozyten, Nierenzellen und Leukozyten verfügen jedoch über normale intrazelluläre Aktivitäten lysosomaler Enzyme, obwohl auch in ihnen die Generierung des M-6-P-Erkennungssignals nicht stattfindet (Kornfeld, Sly, 1995). Des weiteren werden einige lysosomale Enzyme, wie z.B. die  $\beta$ -Glucocerebrosidase, auch in gesunden Fibroblasten M-6-P-unabhängig segregiert (Aerts et al., 1988).

Membranassoziierter, M-6-P-unabhängiger Transport des Precursors der sauren Hydrolase Cathepsin D ist bei verschiedenen Zelltypen, wie z.B. humanen Hepatoma HepG2-Zellen (Rijnboutt et al., 1991 a,b), Maus-Makrophagen (Diment et al., 1988) oder humanen Mamma-Karzinomzellen MCF<sub>7</sub> (Capony et al., 1994) beschrieben worden. In HepG2-Zellen wird Procathepsin D mit zwei co-synthetisierten 68 und 72 kDa schweren Glykoproteinen vernetzt, welche als verschieden glykosylierte Formen des Prosaposins identifiziert wurden, und wahrscheinlich als Komplex mit Prosaposin M-6-P-unabhängig in die Lysosomen transportiert werden (Zhu, Conner, 1994; Grässel, Hasilik, 1992).

Cathepsin D wird in Anwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl in U937-Zellen teilweise und in MCF<sub>7</sub>-Zellen vollständig segregiert (Bräulke et al., 1987; Capony et al., 1994). NH<sub>4</sub>Cl verhindert, wie oben erwähnt, die M-6-P-abhängige Segregation.

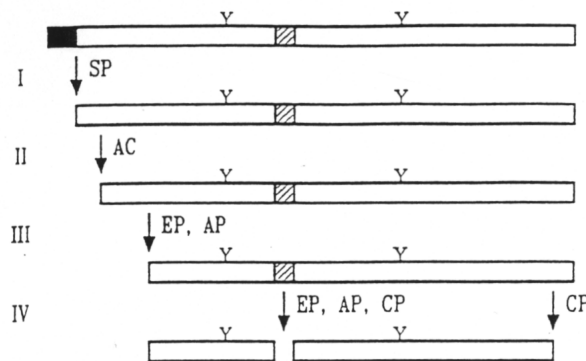
Glickman und Kornfeld zeigten, daß I-Zell-Lymphoblasten unglykosyliertes mutiertes Cathepsin D genauso effizient segregieren, wie glykosyliertes (1993). Des weiteren gibt es Hinweise, daß bei der I-Zell-Krankheit auch in Zellen die normalerweise M-6-P-abhängig segregieren, alternative Transportmechanismen wirken können. So konnte gezeigt werden, daß das lösliche lysosomale Enzym Arylsulfatase A in I-Zell-Fibroblasten M-6-P-unabhängig segregiert wird (Waheed et al., 1988).

### 1.3. Cathepsin D

Cathepsin D ( EC 3.4.23.5 ) ist eine lösliche, saure Aspartylproteinase (Barrett, 1979). Es unterliegt neben der Modifikation seiner Oligosaccharidseitenketten auch einer proteolytischen Reifung. Diese Schritte finden in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle statt (Hasilik et al., 1992; Gieselmann et al., 1983). Bei Cathepsin D erfolgt in vitro eine Autoaktivierung. Das dabei entstehende proteolytisch aktive sogenannte Pseudocathepsin D, welches leichter ist als der inaktive Precursor, konnte jedoch nur in vitro nachgewiesen werden (Hasilik et al., 1982; Richo und Conner, 1994). Das pH-Optimum von Cathepsin D liegt zwischen 3 und 5. Es wird als Prä-Proenzym im ER synthetisiert und an den Asparaginresten 70 und 199 glykosyliert (Faust et al., 1985).

Nach Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase im ER liegt Cathepsin D als 53 kDa schwere Vorläuferform (*precursor*) vor. Dieses Proenzym wird zu einem geringen Teil sezerniert. Nach Phosphorylierung der Zuckerseitenketten und Transport in das prälysosomale Kompartiment entsteht ein 47 kDa schweres Intermediat (Gieselmann et al., 1983; Hasilik, 1992). Nach proteolytischer Spaltung in den Lysosomen liegen zwei reife Formen von Cathepsin D vor, eine schwere Kette (31 kDa), und eine leichte Kette (13 kDa, bzw. 14 kDa).

Die schwere Form des reifen Cathepsin D kann bei bestimmten Erkrankungen unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen. Bei der Mukopolidose II findet man mitunter eine 33 kDa schwere Form (Hasilik und Neufeld, 1980). Bei der Mukopolidose III findet sich die normale Form, sowie mitunter eine 33 kDa schwere Form, welche im Gegensatz zur normalen Form nicht phosphoryliert ist (Hasilik et al., 1981). Die Ursache für diese scheinbar unterschiedliche Prozessierung von Cathepsin D bei den genannten Krankheiten ist unklar.



**Abbildung 6:** Proteolytische Prozessierung von Cathepsin D (Hasilik, 1992)

Nach Abspaltung der Signalsequenz (Reaktion I) im ER liegt Cathepsin D als 53 kDa schweres Proenzym vor. Die Autokatalyse (Reaktion II) und die anschließende Fragmentierung zum Intermediat (47 kDa) geschieht im prälysosomalen Kompartiment (Reaktion III). In den Lysosomen erfolgt die Fragmentierung in eine leichte (14 kDa) und eine schwere (31 kDa) Kette (Reaktion IV).

Symbole: SP: Signalpeptidase; AC: Autokatalyse; EP: Endopeptidase; AP: Aminopeptidase; CP: Carboxypeptidase

Y: Lokalisation der n-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide, Asparaginreste 70 und 199 (Faust et al. 1985)

Das Enzym Endoglycosidase H (Endo H) spaltet Zuckerseitenketten hauptsächlich des mannosereichen Typs, während der komplexe Typ weitgehend Endo H-resistent ist. Nach Einwirkung von Endo H wird also mannosereiches Cathepsin D leichter und wandert in der SDS-Gelelektrophorese weiter, als komplex bezuckertes Cathepsin D.

#### Verschiedene Reifungsformen von Cathepsin D nach Endo H-Behandlung:

Cathepsin D-Form	Lokalisation	Molekulargewicht unbehandelt	Molekulargewicht behandelt
C_C	Medium	53000	53000
C_M	Medium	53000	51000
M_C	Medium	53000	51000
M_M	Medium	53000	49000
C_	Zellen	31000	31000
M_	Zellen	31000	29000
_M	Zellen	14000	12000
_C	Zellen	13000	13000

**Tabelle 1:** Reifungsformen Cathepsin D vor und nach Endo H-Behandlung (Hasilik und von Figura, 1981).

Das Vorliegen von mannose-reichen und komplexen Oligosacchariden, welches durch Behandlung mit Endo H bestimmt wird, ist hier als M für mannose-reich und C als komplex gekennzeichnet.

Die schwere Kette von reifem Cathepsin D liegt in normalen Zellen zu ca. 80 % als mannosereiche Form vor und nur zu ca. 20 % komplex (Hasilik und von Figura, 1981).

## 1.4. Mukolipidosen

Während den meisten lysosomalen Speicherkrankheiten Defekte einzelner lysosomaler Enzyme zugrundeliegen (beispielsweise ist das Tay-Sachs-Syndrom durch einen Defekt der  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Hexosaminidase verursacht), ist bei der Mukolipidose II (I-Zell-Krankheit, oder kurz ML II) und der Mukolipidose III (Pseudo-Hurler-Polydystrophie, oder kurz ML III) die Zielsteuerung lysosomaler Enzyme gestört. Aufgrund eines Defektes der GlcNAc-Phosphotransferase wird das spezifische Sortierungssignal nicht synthetisiert, so daß lysosomale Enzyme verstärkt sezerniert werden (Hasilik et al., 1981; Reitmann et al., 1981). In kultivierten Hautfibroblasten von Mukolipidose-Patienten finden sich zytoplasmatische Einschlüsse (*inclusions*), daher der Name I-Zell-Krankheit (Leroy et al., 1971). Biochemische Analysen identifizierten sie als Anreicherungen von Mukopolysacchariden, Lipiden und Oligosacchariden (Hieber et al., 1975; Dawson et al., 1972; Thomas et al., 1976).

Die ML II wurde zum ersten Mal 1967 beschrieben (Leroy, De Mars, 1967). Sie manifestiert sich meist kurz nach der Geburt und geht normalerweise mit schwerer körperlicher und geistiger Retardierung einher. Selten überleben die Betroffenen die erste Lebensdekade. Die meisten Kinder sterben an rezidivierenden Pneumonien (Kornfeld und Sly, 1995). Einen wesentlich mildereren Verlauf als die I-Zell-Krankheit hat die ML III. Sie wurde zum ersten Mal 1966 beschrieben (Maroteaux, Lamy, 1966). Symptome der ML III treten zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr auf. Die geistige Entwicklung der Patienten ist oft normal. Sie überleben bis ins Erwachsenenalter (Kelly et al, 1975).

Die Diagnose wird klinisch und biochemisch durch Messung der Aktivität lysosomaler Enzyme im Serum gestellt. Auch das Verhältnis von intra- und extrazellulärer Aktivität lysosomaler Enzyme, sowie die Aktivität der Phosphotransferase in kultivierten Fibroblasten kann bestimmt werden. Zwischen ML II und ML III unterschieden wird aufgrund klinischer Kriterien. Die Bestimmung der Phosphotransferaseaktivität ist kein zuverlässiger Parameter für die Unterscheidung von ML II und ML III. Oft ist zwar in ML II-Fibroblasten keine Aktivität messbar, gegenüber einer messbaren Restaktivität von 3-30 % in ML III-Fibroblasten (Hasilik et al., 1981, 1982; Robey und Neufeld,



1982), jedoch gibt es einige Beispiele, bei denen keine Korrelation zwischen gemessener Restaktivität der Phosphotransferase und klinischem Typ besteht (Okada et al., 1985).

Mögliche Klinische Merkmale (nach Kornfeld und Sly, 1995):

## **ML II**

### 1. Skelett:

Kyphoskoliose, Hüftluxation, Klumpfüsse, Gelenkkontrakturen,  
Wirbeldeformitäten, Minderwuchs, Störungen im Sinne einer Dysostosis  
multiplex

### 2. Innere Organe:

Hepatosplenomegalie, Kardiomegalie, Herzvitien

### 3. Zephalo-Fazial:

Vergrößerte Gesichtszüge, Exophthalmus, hyperplastische Gingiva,  
Skaphozephalie, offen gehaltener Mund, tief eingesunkene Nasenwurzel

### 4. Augen:

Hornhauttrübungen, geschwollene Augenlider

### 5. Haut:

Dicke, derbe Haut

### 6. ZNS:

Schwere psychomotorische und geistige Retardierung

Im Rahmen der Symptome besteht eine erhebliche inter- und intrafamiliäre Variabilität. Die molekulare Basis dieses breiten phänotypischen Spektrums ist jedoch noch nicht geklärt. Insbesondere kann im Einzelfall die geistige Beeinträchtigung sehr gering ausfallen (Okada et al., 1985; Whelan et al., 1983; Beck et al., 1995). Die Beteiligung des ZNS bei der ML II ist jedoch ohnehin noch nicht ganz verstanden. Pathologische Studien an Nervenzellen erkrankter Kinder zeigten nur minimale oder gar keine morphologischen Veränderungen, was die Vermutung nahelegt, daß sie ohnehin M-6-P-unabhängig segregieren. Nagashima et al. fanden lediglich lamellenähnliche Einschlüsse in Spinalganglien erkrankter Kinder (1977). Vermutlich sind Gliazellen für die

Pathologie des ZNS bei der Mukopolidose verantwortlich (Martin et al., 1975; Martin et al., 1984). Sie weisen gewöhnlich die auch in Fibroblasten gefundenen *inclusion bodies* auf (Endo et al., 1987; Chang et al., 1996).

### **ML III**

#### 1. Skelett:

Hüftdysplasie, Gelenkkontrakturen, Minderwuchs, Klauenhände,  
Wirbelkörperdysplasie

#### 2. Innerer Organe:

Herzklappenfehler

#### 3. Zephalo-Fazial

Vergrößerte Gesichtszüge

#### 4. Augen:

Hornhauttrübung

#### 5. ZNS:

Geistig normal bis geringgradig retardiert

Das klinische Bild kann sehr variabel sein, jedoch ist es gewöhnlich wesentlich milder als bei der ML II (Kelly et al, 1975). Drei verschiedene Komplementationsgruppen (A, B und C) sind bekannt. Bei Patienten der Gruppen A und B ist die katalytische Funktion der Phosphotransferase gestört, bei Patienten der Gruppe C die Erkennung lysosomaler Enzyme (Varki et al., 1981; Honey et al., 1982). Allerdings besteht keine Korrelation zwischen Komplementationsgruppe und klinischem Verlauf (Honey et al., 1982).

### **1.5. Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit sind Hautfibroblasten von zwei Patienten bezüglich Transport und Modifizierung lysosomaler Enzyme charakterisiert worden. Die Zelllinien werden im weiteren Verlauf mit BIC und CAB bezeichnet.

Beiden Patienten gemeinsam waren stark erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum. Im Falle der ersten Patientin (BIC) entsprachen die körperlichen Merkmale eindeutig einer I-Zell-Krankheit. Erste Symptome waren im Alter von 8 Monaten aufgetreten. Die geistige Entwicklung war jedoch altersentsprechend. Sie besucht eine normale Schule.

Die Befunde des zweiten Patienten (CAB) ließen sich nicht eindeutig einem bestimmten Syndrom zuordnen. Die Erhöhung lysosomaler Enzyme im Serum warf die Frage nach dem Vorliegen einer I-Zell-Krankheit auf.

Geistige Gesundheit bei körperlich eindeutigem Vorliegen einer ML II wie im Falle der ersten Patientin ist zwar schon beschrieben, biochemisch jedoch noch nicht verstanden worden (Beck et al., 1995; Okada et al., 1985). Ein möglicher Erklärungsversuch besteht darin, daß bei diesen Patienten eine verstärkte Nutzung eines M-6-P-unabhängigen Transportes für lysosomale Enzyme angenommen wird, der in einigen Geweben, wie z.B. im ZNS, die Ausprägung des für die I-Zell-Krankheit typischen Phänotyps verhindert. Sollten Fibroblasten, die normalerweise M-6-P-abhängig segregieren, einen M-6-P-unabhängigen Transportweg verstärkt nutzen, so darf angenommen werden, daß dies auch andere mesenchymale Zellen tun, wie z.B. Gliazellen des ZNS. So könnte erklärt werden, unter welchen Umständen I-Zell-Patienten geistig gesund bleiben können.

Es sollte untersucht werden, ob verstärkte Nutzung eines M-6-P-unabhängigen Transportes im Falle unserer Patientin wirksam ist und damit für den ungewöhnlichen Phänotyp verantwortlich sein könnte. Bei positivem Ergebnis wäre zum ersten Mal die klinische Relevanz des M-6-P-unabhängigen Transportweges bei der I-Zell-Krankheit nachgewiesen. Dazu wurden Fibroblasten der Patientin und Kontrollfibroblasten jeweils in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  metabolisch markiert. Cathepsin D wurde aus Zellextrakt und Medien immunpräzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt, sowie mittels Endo H-Verdau bezüglich der Struktur seiner Oligosaccharidseitenketten analysiert. Des weiteren wurden Assays der  $\beta$ -Hexosaminidase aus Medien und Zellextrakten kultivierter Fibroblasten durchgeführt.

Im zweiten Falle sollte versucht werden, anhand der gleichen Methoden die Verdachtsdiagnose Mukopolipidose zu bestätigen, oder zu widerlegen.

Patientensteckbrief BIC:

11 ½ Jahre alt, weiblich, Manifestationsalter: 8 Monate, geistig gesund.

Dysproportionierter Minderwuchs, Thoraxdeformität, BWS-, LWS-Kyphosierung, multiple Gelenkkontrakturen, kurzer Hals, Vergrößerung der Gesichtszüge, derbe Haut, Makroglossie. Röntgenologisch ausgeprägte Veränderungen im Sinne einer Dysostosis multiplex. Im Ultraschall Hypertrophien des Myokards und der Aorten- sowie der Mitralklappe. Lebergröße im obersten Normbereich. Milz nicht vergrößert. Diskrete Hornhauttrübung und chronische Stauungspapille.

Laborchemisch teilweise zehnfach erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum.

Patientensteckbrief CAB:

4 Monate alt, männlich

Geburt in der 36 SSW durch Sectio wegen pathologischem CTG und Dopplerflow, Beckenendlage.

Postnataler Befund:

Sehr hypotone Muskulatur, fixierte Beugehaltung der Extremitätengelenke, Hypoplasie der Finger 2-5 bds., teigige Haut, Retrognathie, kleine Augen, erhebliche neurologische Defizite mit allgemein reduziertem Reflexstatus, röntgenologisch keine knöchernen Fehlbildungen, sonographisch festgestellte Hepatosplenomegalie, Hirnatrophie, regelrechte kardiale Strukturen, ophtalmologisch unauffällig. Laborchemischer Befund: Thrombozytopenie, Erhöhung von AP und Bilirubin, starke Erhöhung einiger lysosomaler Enzyme im Serum. Numerisch und strukturell unauffälliger Karyotyp.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien für Labor und Gewebekultur

#### 2.1.1. Laborgeräte

Brutschrank	Heraeus Function Line
Dampfsterilisator	Zirwus VST 40/60 S
Durchfluß-Kühlgerät	MGW-Lauda K2 RD
Elektrophorese-Stromquelle	Consort E512
Elektrophoresestativ und -kammer	Eigenbau
Enzymassay-Reader	Dynatech MRX
Fotometer	Pharmacia Novaspec II
Kulturflaschen	Greiner
Magnetrührer	Ika HTR 80-68
Microtiterplatten	Nunc 96-Vals
-70°-Schrank	Refko
pH-Meter	Mettler Delta 320/350
Phospho-Imager	Molecular Dynamics Image Eraser SF
Präzisionswaagen	Sartorius Typ 2604, 2255, BP 410
Reinstwasseranlage	Millipore, Milli-Q
Spektralfotometer	Pharmacia Ultrospec 3000
Sterilbänke	Hera Safe Heraeus Instruments Typ HS12-2
Sterile Vals	Nunc
Szintillationsmeßgerät	Canberra-Packard 1600 TR
Trockensterilisator	Heraeus UT 12
Ultraschallbad	Laboratories Supplies Corporation Inc.
Umkehrmikroskop	Zeiss Televal 31
Vakuumpumpe	Eigenbau
Vortex	Scientific Industries, Vortex-Genie 2
Wasserbäder	GFL

Wippe	Eigenbau
Zellzählgerät	Schärfe Systems, Casy 1
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Sorvall Centrifuges Eppendorfszentrifuge, Centrifuge 5415 C Heraeus Biofuge Sepatech Hettich Universal Zentrifuge

### 2.1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer
DNAse	Sigma
Endoglycosidase H	Boehringer

### 2.1.3. Antikörper

Antiserum gegen Cathepsin D / Glyzerin 50%	Eigene Herstellung
--	--------------------

### 2.1.4. Radiochemikalien

Tran <sup>35</sup> S-Label: [ <sup>35</sup> S]- Cys / Meth	ICN
--	-----

### 2.1.5. Laborchemikalien

Acrylamid	Serva
APS	Merck
β-D-glucopyranosid	Sigma
Bisacrylamid	Serva
Bradfordreagenz	Biorad

Bromphenolblau	Merck
BSA	Serva
CaCl <sub>2</sub>	Merck
DTT	ICN
EDTA	Sigma
Ethanol	Roth
FKS	Sigma
Glycerin	Serva
Glycin	Roth
Instant Scint-Gel	Packard
Jodacetamid	Sigma
Ka- Na- Tartrat	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Merck
NaAcetat	Merck
NaCitrat	Merck
NaF	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Merck
NaN <sub>3</sub>	Merck
Natriumphosphat	Merck
NH <sub>4</sub> Cl	Merck
NP40	Roth
p-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy-	
p-Nitrophenylphosphat	Boehringer
PMSF	Serva
SDS	Roth
Streptomycin	GIBCO-BRL
TEMED	Sigma
Triethanolamin	Merck
Tris-Puffer	Roth
Triton-X-100	Serva
Trypsin-Lsg.	GIBCO
ZnCl <sub>2</sub>	Merck

---

### 2.1.6. Eukaryonte Zelllinien

1. Kontrollzellen: Humane Hautfibroblasten der Zelllinie BON
2. Patienten-Hautfibroblasten der Zelllinie BIC
3. Patienten-Hautfibroblasten der Zelllinie CAB

Humane Hautfibroblasten wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kresse und Prof. Dr. Filipovic, Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Münster.

Die Fibroblastenzelllinien BIC und CAB stammen von Hautbiopsien von Patienten und wurden von PD Dr. M.Beck, Kinderklinik der Universität Mainz, zu Verfügung gestellt.

### 2.1.7. Medien und Waschlösungen

Minimal Essential Medium (MEM), Eagle, 1959

Hank`s Waschlösung:	CaCl <sub>2</sub>	140	mg/l
	KCl	400	mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60	mg/l
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	100	mg/l
	NaCl	8000	mg/l
	NaHCO <sub>3</sub>	350	mg/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	90	mg/l
	D-Glucose x H <sub>2</sub> O	1000	mg/l
	Phenolrot	10	mg/l

Puck`s Lösung:	0.8	%	(w/v)	NaCl
	0.04	%	(w/v)	KCl
	0.035	%	(w/v)	NaHCO <sub>3</sub>



	0.1	%	(w/v)	Glucose
	0.02	%	(w/v)	EDTA
	0.1	%	(w/v)	Trypsin
PBS:	0.9	%	(w/v)	NaCl
	1		mM	Natriumphosphat
TBS:	0.9	%	(w/v)	NaCl
	10		mM	Tris / HCl pH 7.4
Markierungsmedium:	MEM / -Cys; -Meth			
Defizientes Medium:	MEM / - [ L-Glutamin, L-Methionin, L-Cystein, D-Glucose, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , MnSO <sub>4</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , FeSO <sub>4</sub> ]			

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkultur

Humane Hautfibroblasten werden in sterilen Kulturflaschen bei 37° C im Kulturmedium (MEM) in Gegenwart von 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS sowie 0.1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes des Mediums werden die Zellen in einem ca. 5% CO<sub>2</sub>- Luft- Gemisch gehalten. Zu diesem Zweck werden die Zellen entweder permanent oder unmittelbar vor dem Verschließen der Gasdicht schließenden Kulturflaschen begast. Im konfluenten Stadium werden die Zellen ausgedünnt.

#### **2.2.1.1. Aussaat der Zellen**

Zum Ausdünnen konfluenten Zellen oder Überführen in Petrischalen zum Zwecke metabolischer Markierung müssen die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Dazu inkubiert man die Zellen nach Absaugen des Mediums und zweifachem Waschen mit Hank's-Lösung bei 37° C in 1 ml Trypsinhaltiger Puck's-Lösung. Nach 5-10 min werden die nun in Suspension befindlichen Zellen in Kulturmedium überführt. Nach Adhärenz der Zellen wird das Trypsin haltige Medium gewechselt.

#### **2.2.1.2. Zellzählung**

Zum Zwecke der Zellzählung werden die Zellen, wie oben beschrieben, vom Boden der Kulturflasche oder Petri-Schale gelöst. Die Einwirkung der Puck's-Lösung wird durch Zugabe von ca. 4 ml MEM-Kulturmedium gestoppt, um Schaden an den Zellmembranen zu verhindern. Die Suspension wird in isotonische Lösung überführt und der automatischen Zellzählung unterworfen.

#### **2.2.2. Metabolische Markierung**

Zur radioaktiven Markierung der Zellen werden ca. 200000 Zellen pro Minischale (3.5 mm Durchmesser) transplantiert. Nach einer Wachstumsdauer von ca. 2-3 Tagen wird den nun konfluenten Zellen das Medium entzogen und für ca. 30-60 min durch ein defizientes Medium ersetzt. Das hat den Zweck, einen intrazellulären Abbau der Substanz zu ermöglichen, mit der danach markiert wird, sowie den gesamten Stoffwechsel der Zellen zu drosseln. Nach dem "Hungern" erfolgt die Markierung mit der radioaktiven Markierungssubstanz (Label) in 1ml Markierungsmedium. Die Markierungsdauer beträgt je nach Experiment 0.5 - 24 Stunden. Bei Pulse-Chase-Versuchen wird das Markierungsmedium nach der entsprechenden Zeit durch ein normales MEM ersetzt und mit der nicht radioaktiven Markierungssubstanz im Überschuß versetzt.

Je nach Versuchserfordernis wird das Medium unmittelbar vor Zugabe des Labels mit 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  versetzt.

#### **2.2.2.1. Ernten der markierten Zellen und Medien**

Nach Beendigung der Markierung werden die Medien (jeweils 1ml) abgenommen und in Eppendorfgefäßen mit 200  $\mu\text{l}$  5x Immunomix / 1% SDS + Inhibitoren versetzt. Die Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen, mit 2x 500  $\mu\text{l}$  1x Immunomix / 0.2 % SDS + Inhibitoren versetzt, mittels Gummischaber vom Boden der Petrischale abgeschabt und in Eppendorfgefäße überführt. Medien und Zellen werden nun 20 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, danach zum Zwecke der Zellfraktionierung 3 Frier-Tau-Schritten unterworfen. Anschließend werden sie eine Stunde lang bei 4°C mit 20000 U/min zentrifugiert.

1x Immunomix:	10	mM	Natriumphosphat pH 7.4
	150	mM	NaCl
	5	mg/ml	BSA
	0.5	% (w/v)	Na-Desoxycholat
	1.0	% (w/v)	Triton X-100

5x Immunomix:       entsprechend 5x konzentriert

##### Immunomix mit Inhibitoren

zusätzlich:	5	mM	Iodacetamid
	1	mM	PMSF
	1	mM	$\text{MgCl}_2$
	20	$\mu\text{l/ml}$	DNAse

5x Immunomix enthielt die entsprechende fünffache Inhibitorenkonzentration.

Inhibitoren werden unmittelbar vor Gebrauch dem Immunomix zugesetzt.

#### **2.2.2.2. Immunpräzipitation von Cathepsin D aus Zellhomogenat und Medien**

Von den Überständen werden jeweils 500 µl mit je 5 µl Antiserum / Glycerin 50 % gegen Cathepsin D über Nacht bei 4° C auf der Wippe inkubiert.

#### **2.2.2.3. Messen der Einbauraten mittels Szintillationszähler**

Um die Verteilung der Radioaktivität in Medien und Zellen und damit den intrazellulären Einbau der Markierungssubstanz beurteilen zu können, werden jeweils 2 µl der Überstände in 2 ml Insta-Gel einer Messung im Szintillationszähler unterworfen. Der Rest des Überstandes wird bei -20° C eingefroren.

#### **2.2.2.4. Konjugation von Antikörpern an Staph-A-Zellwandextrakt**

Nach ca. 16 h wurde den Proben ca. 30 µl Staphylococcus-aureus-Zellwandextrakt zugegeben.

Nach einstündiger Inkubation bei 4° C auf der Wippe werden die Immunpräzipitate durch fünfminütige Zentrifugation bei 13000 U/min in der Eppendorffzentrifuge pelletiert und anschließend mit je 400 µl der folgenden kalten Waschpuffer gewaschen:

1. Immunomix / 0.2% SDS
2. Immunomix / 2 M KCl
3. Neufeld-Puffer:
 

10	mM	Tris / HCl pH 8.5
600	mM	NaCl
0.1	%	SDS
0.05	%	NP40
4. 2 x 100 mM Tris pH 7.4 / 0.02 % SDS

Die Überstände werden eingefroren.

### 2.2.2.5. Lösen der Immunkomplexe

Die gewaschenen Pellets werden dann zur Lösung der Immunkomplexe mit je 65 µl halbkonzentriertem Solubilizer versetzt, gevortext und 5 Minuten bei 95° C im Heizblock erhitzt.

1x Solubilizer:	250	mM	Tris / HCl pH 6.8
	20	mM	DTT
	2	%	SDS
	17.4	%	Glyzerin

Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min in der Eppendorfzentrifuge wird der Überstand, der nun das markierte Cathepsin D enthält auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Pellet wird eingefroren oder verworfen.

### 2.2.3. Behandlung von Immunpräzipitaten mit Endoglycosidase H

Die Behandlung von Immunpräzipitaten lysosomaler Enzyme mit Endoglycosidase H (nach Kobata, 1979) dient dazu, den Anteil komplexer und mannosereicher Zuckerseitenketten zu bestimmen. Endo H spaltet vorwiegend N-Glycane vom mannosereichen Typ. Komplexe und hybride Zuckerseitenketten sind Endo H- resistent.

Das Waschen der Immunkomplexe wird zu diesem Zweck durch einen weiteren Waschschrift mit 50 mM Tris pH 7.0 / 0.02 % SDS ergänzt.

Das Pellet wird in den 1:4-verdünnten EH-Puffer aufgenommen und nach 6 minütigem Aufkochen bei 95° C mit 5 µl 0.5 M NaPi / pH 5.35 und 85 µl H<sub>2</sub>O versetzt.

EH-Puffer:	100	mM	NaPi / pH 5.35
	2	%	SDS
	10	mM	DTT

Die Probe wird dann in der Eppendorffzentrifuge pelletiert und der Überstand halbiert, wobei eine Hälfte mit 1 mU (= 1 µl) versetzt wird. Die andere Hälfte bleibt unbehandelt. Nach 6-12 Stunden wird erneut 1 mU Endo H zugegeben. Die Inkubation wird nach 24 h im 37° C - Wasserbad durch Zugabe von 20 µl 1.43 x Solubilizer und fünfminütigem Aufkochen bei 95°C beendet. Anschließend werden die Proben auf ein SDS-Page aufgetragen.

#### **2.2.4. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wird ein 1.5 mm dickes 14 % SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Es besteht aus zwei Phasen, einem Trenngel und einem Sammelgel.

Das Trenngel wird bis ca. 3 cm unter den Rand in die vorgefertigte Apparatur gegossen. Nach dessen Polymerisation wird das Sammelgel bis oben hin aufgetragen. Mit einem Plastikamm werden die Taschen des Gels ausgeformt. Die Proben werden in die Taschen aufgetragen und mit bromphenolblau-haltigem Top-Puffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wird, bis die Bromphenolblaubande das Trenngel erreicht hat, mit 20 mA betrieben, danach mit 30 mA. Sie wird beendet, wenn die Bande unmittelbar vor dem unteren Rand des Gels liegt.

Als Standards laufen Phosphorylase B (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), Ovalbumin (45.2 kDa), Carboanhydrase (30 kDa) und Cytochrom C (12.3 kDa) mit. Diese radioaktiven Standards werden durch Inkubation mit [<sup>14</sup>C] KCNO und anschließender Dialyse gegen PBS hergestellt (Hasilik et al, 1982).

**2.2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gel**

	Sammelgel ( in ml )	Trenngel ( in ml )
30 % Acrylamid	1.6	13
1 % Bisacrylamid	1.1	4
1.5 M Tris / HCl pH 8.8	-	7.5
0.5 M Tris / HCl pH 6.8	2.5	-
Aqua dest.	4.7	5.1
10 % SDS	0.1	0.3
TEMED	0.01	0.025
25 % APS	0.04	0.1

**Tabelle 2:**SDS-Polyacrylamid-Gel

Anoden- und Kathodenpuffer werden mittels Durchflußkühlgerät auf 4° C gekühlt.

Anodenpuffer:	30	g	Tris
	144	g	Glycin
	ad 5 l Aqua dest.		
Kathodenpuffer:	250	ml	Anodenpuffer
	2.5	ml	10 % SDS
	200	µl	Bromphenolblau

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 20-25 min lang in Kathodenpuffer ( ohne Bromphenolblau und SDS) geschwenkt, um das SDS herauszuwaschen. Zur Verkleinerung des Gels wird es 5-10 min lang in techn. Ethanol geschwenkt, welches danach kurz mit Aqua dest. abgespült wird, um es dann blasenfrei zwischen die gewässerte Zellophanfolie des Trockenständers zu legen. Nach Trocknung über Nacht mittels Vakuumpumpe wird es in die Expositionskassette des Phosphoimagers gelegt.

**2.2.4.2. Auswertung der SDS-PAGE mittels Phospho-Imager**

Der Zeitraum der Exposition variiert je nach Isotop und nach vorhandener Menge an Radioaktivität. Die exponierte Imager-Platte wird im Phospho-Imager eingescannt. Die Banden lassen sich am Monitor anhand der entsprechenden Software nachweisen und

quantitativ auswerten. Die Intensität jeder Bande muß jeweils um den Backgroundwert nach unten korrigiert werden.

#### **2.2.4.3. Vorbereitung der Gele für die Fluorographie**

Zur Verstärkung und Verschärfung der Gelbanden wird das Gel nach Beendigung der Elektrophorese dreimal 20 min lang in DMSO entwässert, anschließend mindestens 3 h in 16.8 % (w/v) DPO in DMSO inkubiert und danach für ca. 45 min entwässert. Danach wird das Gel in Zellophanlagen eingelegt und mittels Vakuumpumpe getrocknet (Laskey, Mills, 1975).

Zur qualitativen Auswertung der Gele werden die radioaktiven Banden auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Dazu werden die Gele bei -70°C einem Röntgenfilm, je nach Markierungsintensität, Tage bis Wochen exponiert. Zur Sensibilisierung wird der Film vor der Exposition mit geringer Lichtstärke geblitzt.

#### **2.3. Gewinnung von Zellextrakt**

Zur Bestimmung von Gesamtprotein und Enzymaktivitäten aus Zellextrakt werden die Zellen nach Abnahme des Kulturmediums zweimal mit kaltem 10 mM TBS gewaschen, mit dem Gummischaber in 2 x 500 µl Homogenisierungspuffer geerntet, zwei Frier-Tau-Schritten unterworfen und 3 x 10 sec im Ultraschallbad behandelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min werden die Überstände zur Messung herangezogen.

Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris / HCl pH 7.4



## 2.4. Enzymassays

$\beta$ -Hexosaminidase (EC 3.2.1.52.):

Als Hauptmarkerenzym lysosomaler Enzyme wird die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase aus Medien und Zellextrakt bestimmt (nach von Figura, 1977).

Substrat:	p-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy- $\beta$ -D-glucopyranid
Substratpuffer:	100 mM Natriumacetatpuffer pH 4.6
	10 mM Substrat
	0.2 % BSA
	0.2 % Triton X-100
	0.04 % $\text{NaN}_3$
Stopplösung:	0.4 M Glycin / NaOH pH 10.4

50  $\mu\text{l}$  des Substratpuffers wird mit 50  $\mu\text{l}$  der zu messenden Probe versetzt und bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Jede Probe wird unverdünnt, 2 x verdünnt, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, so daß von jeder Probe mindestens vier Messwerte vorliegen. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung gestoppt. Die  $\beta$ -Hexosaminidase spaltet das Substrat in N-acetylglucosamin und p-Nitrophenol, welches in alkalischer Lösung als gelbgefärbtes p-Nitrophenolat vorliegt und dessen Konzentration photometrisch bei 405 nm gegen einen Leerwert gemessen wird.

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  405 nm für p-Nitrophenolat beträgt 18.5  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ . Die Einheit U ist definiert als die Menge an Enzym, die 1  $\mu\text{mol}$  Substrat pro Minute bei Standardbedingungen umsetzt. Daher berechnet sich die Aktivität des Enzyms nach der Formel:

$$\text{Aktivität} [mU / ml] = \frac{\text{Volumen}_{\text{Ansatz}} [ml] \cdot 1000}{18,5 \cdot \text{Volumen}_{\text{Probe}} [ml] \cdot t [\text{min}]} \cdot E$$

Die im Medium kultivierter Zellen gemessene Enzymaktivität wird um einen im FKS-Kulturmedium gemessenen Leerwert korrigiert.

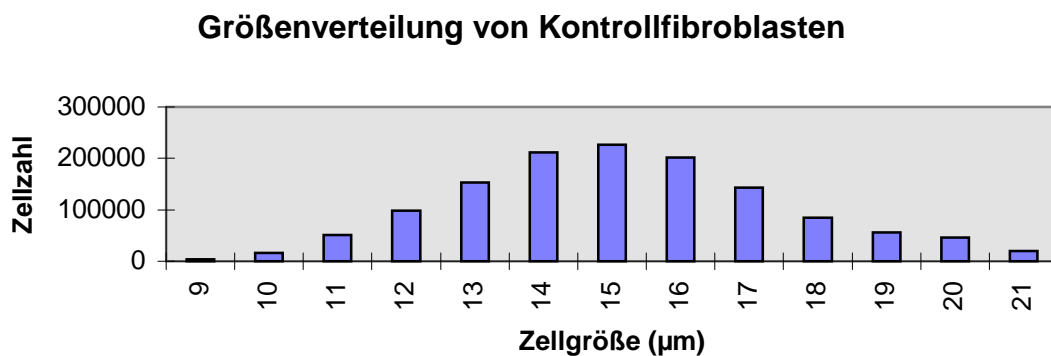
### 3. Ergebnisse

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf ihre Größe (= Durchmesser) und auf ihr Wachstumsverhalten hin im Vergleich zu Normalfibroblasten charakterisiert. Es zeigte sich dabei, daß die in den Zellen vorliegenden Stoffwechselstörungen auf beide Merkmale zumindest keinen wesentlichen Einfluß hatten.

#### 3.1. Zellgrößenverteilungen

Nach einer Wachstumszeit von vier Tagen wurden die Zellen geerntet und ihre Größenverteilung im Zählgerät automatisch ausgewertet.

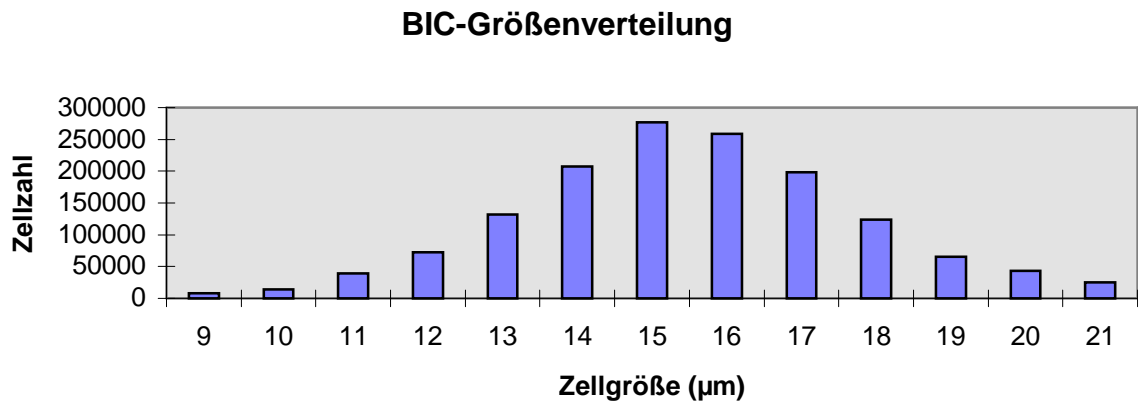
Es ergaben sich folgende Größenverteilungen:



**Abbildung 7**

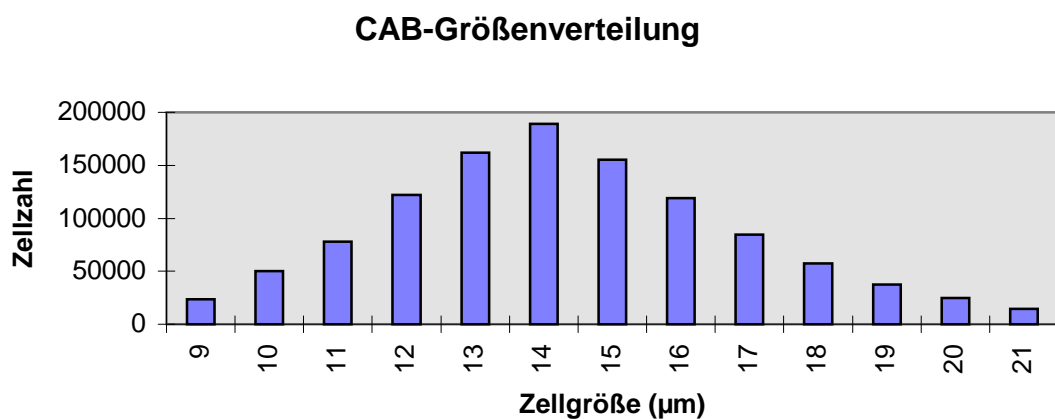
Gesamtzellzahl: 1310200

Durchschnittliche Zellgröße: 15,15 µm

**Abbildung 8**

Gesamtzellzahl: 1463400

Durchschnittliche Zellgröße: 15,47 µm

**Abbildung 9**

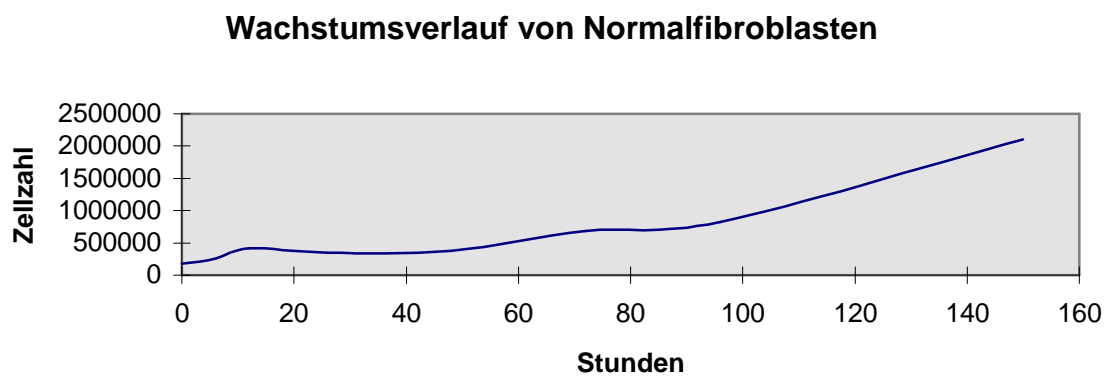
Gesamtzellzahl: 1117400

Durchschnittliche Zellgröße: 14,31 µm

### 3.1.2. Wachstumsverlauf kultivierter Testzellen

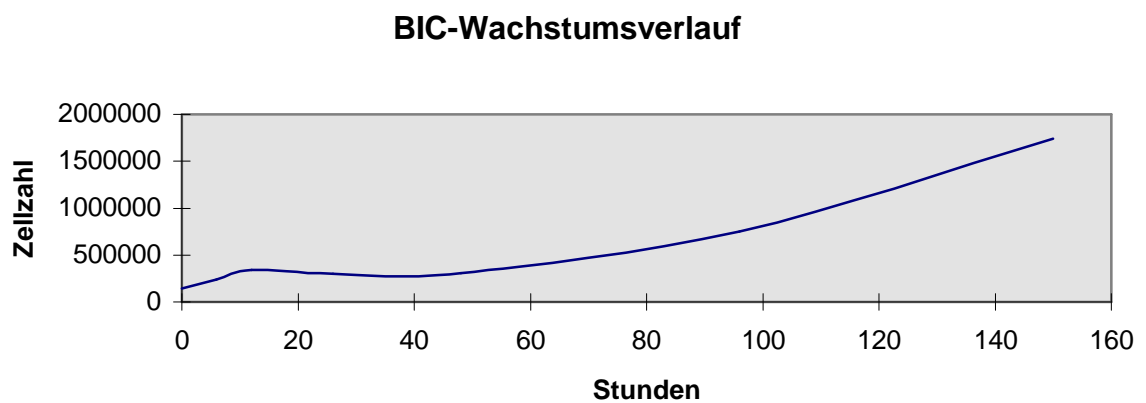
Zum Zeitpunkt Null wurden auf mehrere Petri-Schalen jeweils gleichviele Zellen ausgesät und zu definierten Zeitpunkten abgeerntet und gezählt. So wurde mit jeder einzelnen Zellreihe verfahren, wobei die jeweilige Ausgangszellzahl ungefähr gleich war.

Es ergaben sich folgende Wachstumsverläufe:



**Abbildung 10**

Zellzahl zum Zeitpunkt 0: 180000



**Abbildung 11**

Zellzahl zum Zeitpunkt 0: 146000

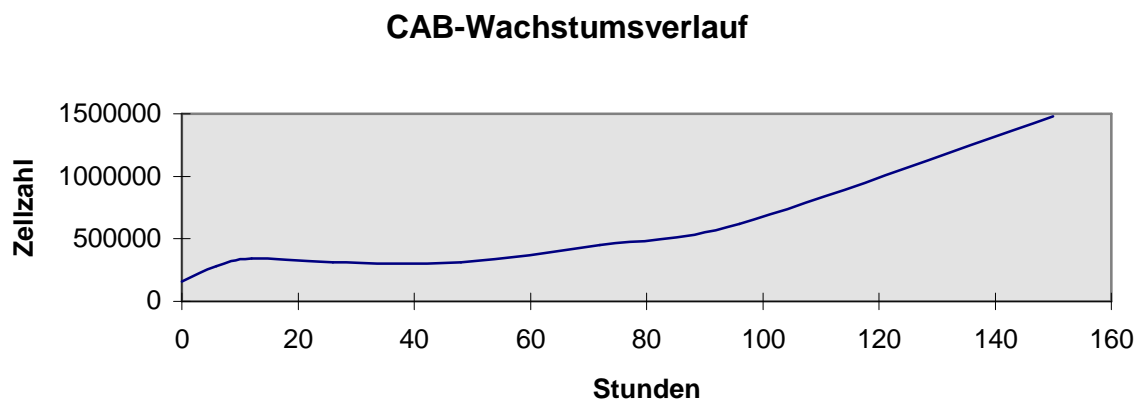


Abbildung 12

Zellzahl zum Zeitpunkt 0: 160000

### 3.2. Metabolische Markierungen in An- und Abwesenheit von $\text{NH}_4\text{Cl}$

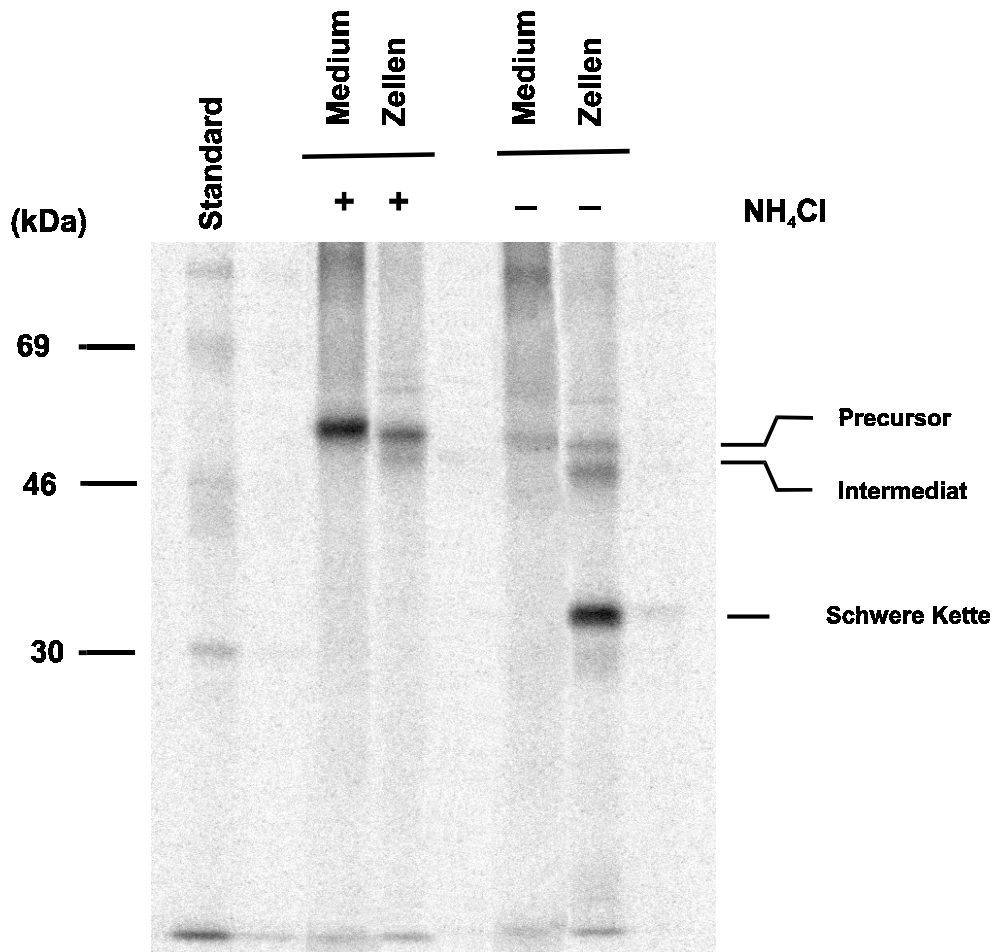
Metabolische Zellmarkierungen mit  $[\text{}^{35}\text{S}]$ -Cys/Meth mit anschließender Immunpräzipitation von Cathepsin D aus Medium und Zellextrakt dienen dem Zweck, die Sortierung von Cathepsin D zu beurteilen. Bei gesunden Zellen erwartet man einen hohen intrazellulären Anteil an reifem Cathepsin D, gegenüber einem geringen Anteil von sezerniertem Precursor.

Bei Mukopolipidose II/III-Zellen erwartet man einen hohen Anteil von extrazellulärem Cathepsin D-Precursor, welcher aufgrund des fehlenden Sortierungssignals nicht weiter prozessiert und in die Lysosomen transportiert wird, sondern stattdessen sezerniert wird. Humane Fibroblasten verlieren in Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ihre Fähigkeit, lysosomale Enzyme Mannose-6-Phosphat-abhängig zu segregieren, weil die von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  vermittelte Anhebung des pH-Wertes in membranumschlossenen Zellkompartimenten die Ablösung des Liganden vom M-6-P-Rezeptor verhindert. Lösliche lysosomale Enzyme werden daraufhin verstärkt sezerniert (Kornfeld, 1992; von Figura, Hasilik, 1986).  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -insensitive Segregation muß also auf M-6-P-unabhängigen Transportmechanismen beruhen (Bräulke et al., 1987).

Um die Sortierung von Cathepsin D und das Maß einer eventuellen M-6-P-unabhängigen Restsortierung abschätzen zu können, wurden die zu testenden

Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollfibroblasten in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  metabolisch markiert.

### 3.2.1. Sortierung von Cathepsin D bei Kontrollfibroblasten



**Abbildung 13:** Verteilung von Cathepsin D in Zellen und Medien von kultivierten Kontrollfibroblasten in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Kontrollfibroblasten im konfluenten Stadium wurden nach Zugabe von 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  über Nacht mit je 24  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Cys/Meth inkubiert. Cathepsin D wurde aus Zellhomogenat und Medien immunpräzipitiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Nach einer Expositionszeit des Gels in der Imager-Cassette von 140 h wurden die Banden quantifiziert.

Die unbehandelten Zellen zeigen bei Beendigung des Pulse die physiologische Verteilung von Cathepsin D, nämlich intrazellulär einen Anteil von 89 %, gegenüber 11 % extrazellulärem Cathepsin D (Tabelle 3).

Um das Maß der lysosomalen Sortierung von Cathepsin D zu ermitteln, wird der intrazelluläre Precursor nicht berücksichtigt, da seine Verteilung noch nicht abgeschlossen ist. Das ist unter der Annahme erlaubt, daß der intrazelluläre Precursor

im weiteren Verlauf anteilmäßig gleichermaßen prozessiert und transportiert wird, wie bis zur Beendigung des Pulse. Für Kontrollfibroblasten ergibt sich dabei ein Wert von 88 % (Tabelle 3).

Nach dem gleichen Prinzip wird die lysosomalen Sortierung von Cathepsin D bei Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  berechnet. Die behandelten Zellen hatten bei Beendigung des Pulse insgesamt 61% des Cathepsin D sezerniert. Es berechnet sich eine lysosomale Sortierung von 15% (Tabelle 4).

Quantifizierung der Banden:

- $\text{NH}_4\text{Cl}$	Medien	Zellen
Precursor	10 %	12 %
Intermediat	1 %	20 %
Reife Form	-	57 %
Gesamt	11 %	89 %
Lysosomale Sortierung		88 %

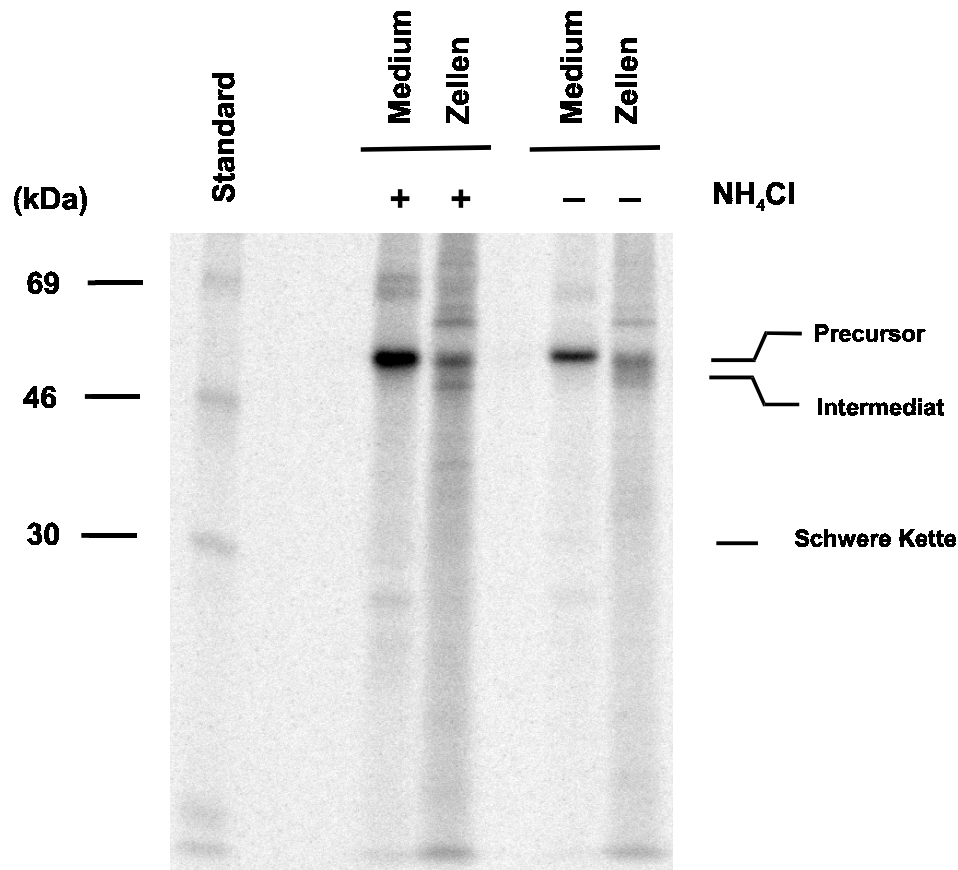
Tabelle 3: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei kultivierten Kontrollfibroblasten. Bei der Quantifizierung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text.

+ $\text{NH}_4\text{Cl}$	Medien	Zellen
Precursor	61 %	28 %
Intermediat	-	11 %
Reife Form	-	- %
Gesamt	61 %	39 %
Lysosomale Sortierung		15 %

Tabelle 4: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -behandelten kultivierten Kontrollfibroblasten. Bei der Quantifizierung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text.

### 3.2.2. Sortierung von Cathepsin D bei BIC-Fibroblasten

Auf die gleiche Weise wurde bei den BIC-Fibroblasten verfahren. Bemerkenswert ist das Cathepsin D-Verteilungsmuster der unbehandelten Zellen. Es zeigt sich ein hoher Anteil im Kulturmedium, nämlich 63 %, gegenüber 37% intrazellulär, wobei Cathepsin D noch nicht vollständig zur reifen Form gereift ist. Analog zu den Kontrollfibroblasten errechnet sich eine lysosomale Sortierung von Cathepsin D unter Normalbedingungen von 21 % (Tabelle 5).



**Abbildung 14:** Verteilung von Cathepsin D in Zellhomogenat und Medien von BIC-Fibroblasten in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Vorgehen wie bei Kontrollfibroblasten. Zugabe von  $60 \mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Cys/Meth. Expositionszeit: 111 h.

In Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  erscheint Cathepsin D nach Beendigung des Pulse insgesamt extrazellulär zu 71 % und intrazellulär zu 29 %. Die Lysosomale Sortierung des neusynthetisierten Cathepsin D beträgt nach Blockierung des M-6-P-abhängigen Transports noch 15 % (Tabelle 6).

Quantifizierung der Banden:

$-\text{NH}_4\text{Cl}$	Medien	Zellen
Precursor	63 %	20 %
Intermediat	-	17 %
Reife Form	-	- %
Gesamt	63 %	37 %
Lysosomale Sortierung	21 %	

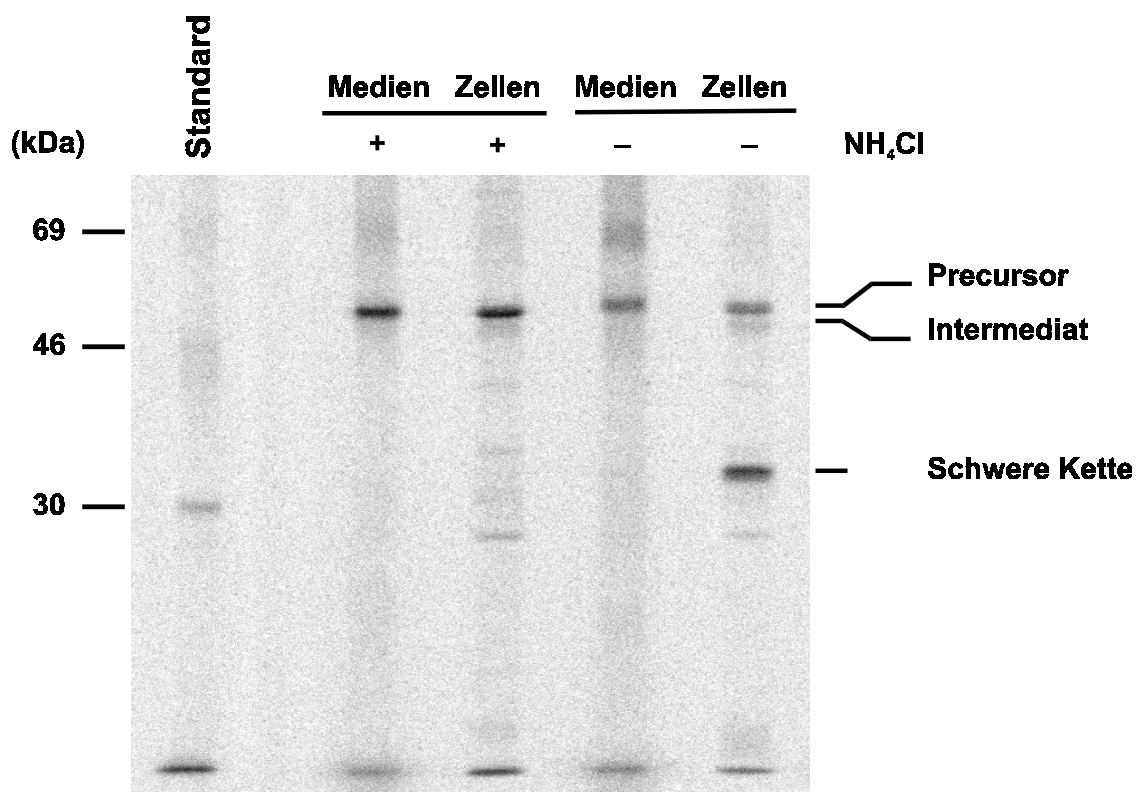
Tabelle 5: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei kultivierten BIC-Fibroblasten. Bei der Berechnung der Quantifizierung wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um Mittelwerte aus drei Messungen.



+NH <sub>4</sub> Cl	Medien	Zellen
Precursor	71 %	16 %
Intermediat	- %	13 %
Reife Form	-	- %
Gesamt	71 %	29 %
Lysosomale Sortierung	15 %	

Tabelle 6: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei NH<sub>4</sub>Cl-behandelten kultivierten BIC-Fibroblasten. Bei der Quantifizierung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text. Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um Mittelwerte aus drei Messungen.

### 3.2.3. Sortierung von Cathepsin D bei CAB-Fibroblasten



**Abbildung 15:** Verteilung von Cathepsin D in Zellhomogenat und Medien von CAB-Fibroblasten in An- und Abwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl.

Vorgehen wie bei Kontrollfibroblasten. Zugabe von 32,5 µCi [<sup>35</sup>S]-Cys/Meth. Expositionszeit: 240 h.

Bei den CAB-Fibroblasten ergab sich folgender Befund: Bei Beendigung des Pulse fanden sich bei unbehandelten Zellen 76 % vom gesamten Cathepsin D in den Zellen und 24 % im Medium (Tabelle 7). Analog den Kontrollfibroblasten wurde bei der Berechnung der lysosomalen Sortierung der intrazelluläre Precursor nicht berücksichtigt. Der für CAB-Fibroblasten berechnete Wert liegt bei 68 % (Tabelle 7),

der damit zwar etwas geringer ausfällt als bei den Kontrollzellen (88%, Tabelle 3), jedoch wesentlich mehr als bei den BIC-Fibroblasten (15 %, Tabelle 5).

Die intrazelluläre Restreifung von Cathepsin D unter  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Einfluß wird analog den Kontrollen und den BIC-Fibroblasten berechnet. Sie beträgt bei den CAB-Fibroblasten 12 % (Tabelle 8) gegenüber 15 % bei den Kontrollzellen (Tabelle 4).

Quantifizierung der Banden:

$-\text{NH}_4\text{Cl}$	Medien	Zellen
Precursor	24 %	24 %
Intermediat	- %	9 %
Reife Form	- %	43 %
Gesamt	24 %	76 %
Lysosomale Sortierung		68 %

Tabelle 7: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei kultivierten CAB-Fibroblasten. Bei der Quantifizierung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text.

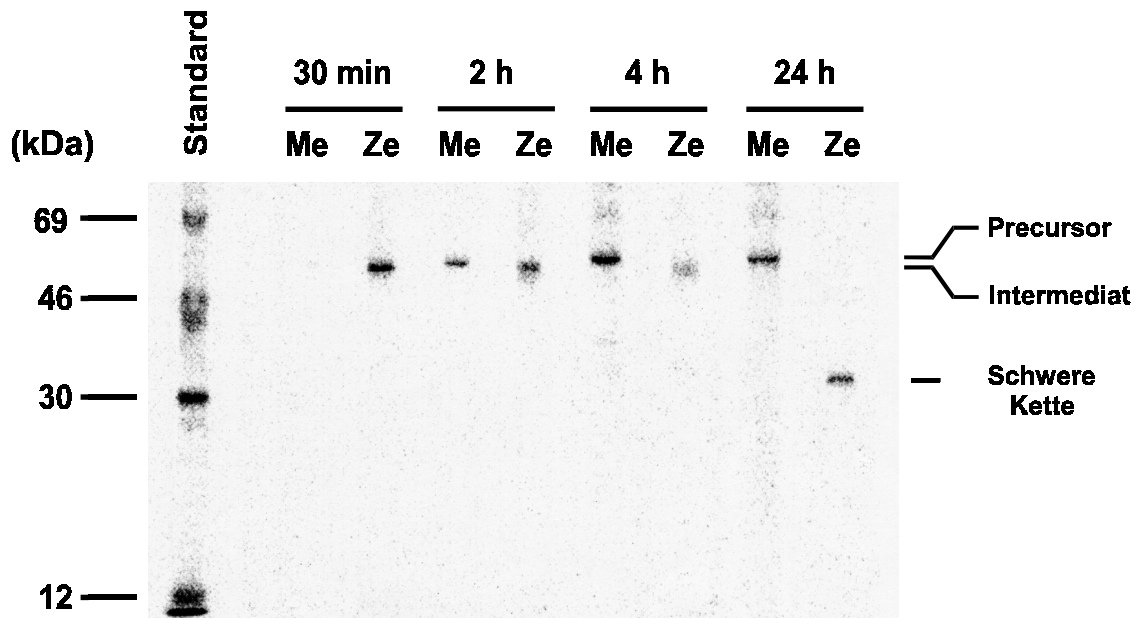
$+\text{NH}_4\text{Cl}$	Medien	Zellen
Precursor	46 %	48 %
Intermediat	- %	6 %
Reife Form	- %	- %
Gesamt	46 %	54 %
Lysosomale Sortierung		12 %

Tabelle 8: Verteilung von extra- und intrazellulärem Cathepsin D bei  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -behandelten CAB-Fibroblasten. Bei der Quantifizierung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Zur Berechnung der lysosomalen Sortierung siehe Text.

### 3.3. Pulse-Chase-Markierung der BIC-Fibroblasten

Um Transport und Prozessierung lysosomaler Enzyme zeitlich zu verfolgen, wurden Pulse-Chase-Markierungen an den BIC-Testzellen durchgeführt. Dabei wurde Cathepsin D nach einstündiger Markierungszeit aus Zellen und Medien zu verschiedenen Chase-Zeiten immunpräzipitiert. So ließ sich chronologisch der Weg des Cathepsin D vom ER ins Medium bzw. in die Lysosomen verfolgen.

Bei Pulse-Chase-Markierungen mit langen Chase-Zeiten wird außerdem der Anteil an intrazellulärem Precursor stark reduziert und damit der Anteil an Enzym, dessen Sortierung noch nicht abgeschlossen ist.



**Abbildung 16:** Immunpräzipitation von Cathepsin D aus Zellhomogenat und Medien von BIC-Fibroblasten nach einstündigem Pulse und Chase zu verschiedenen Zeitpunkten

Im subkonfluenten Stadium wurden Fibroblasten in vier Minischalen mit jeweils 18,75  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Cys / Meth zwei Stunden lang markiert. Nach Wechseln des Mediums wurden nach 30 min, 2 h, 4 h und 24 h jeweils Zellen und Medien geerntet, Cathepsin D immunpräzipitiert und die Proben mittels SDS-Gel getrennt. Expositionszeit: 240 h.

Nach einer Chase-Zeit von 30 min findet sich intrazellulär noch vornehmlich neu synthetisierter Cathepsin D-Precursor. Reifes Cathepsin D ist noch nicht prozessiert worden. Der ins Medium sezernierte Anteil ist mit 9 % noch sehr gering. Nach zweistündigem Chase findet sich immerhin schon fast die Hälfte des produzierten Proteins im Medium als Precursor. Bildung von Intermediat hat schon stattgefunden. Nach 4 Stunden sind fast dreiviertel des gesamten Cathepsin D sezerniert. Demgegenüber hat sich der Anteil von extra- und intrazellulärer Verteilung von Cathepsin D nach 24 Stunden nicht mehr wesentlich geändert, wohl aber der intrazelluläre Anteil an reifem Enzym. Nach 24 h liegt intrazelluläres Cathepsin D als vollständig prozessiertes reifes Enzym vor (Tabelle 9).

Es ist gut zu erkennen, daß der Anteil von Cathepsin D, der als Intermediat vorliegt, nicht ins Medium sezerniert wird, sondern in die Lysosomen gelangt. Das liegt daran, daß Intermediat erst nach Lösung des Cathepsin D-Precursors vom Rezeptor, also bei intakter Zielsteuerung, in einem prälysosomalen Kompartiment gebildet wird (Hasilik, 1992).

Quantifizierung:

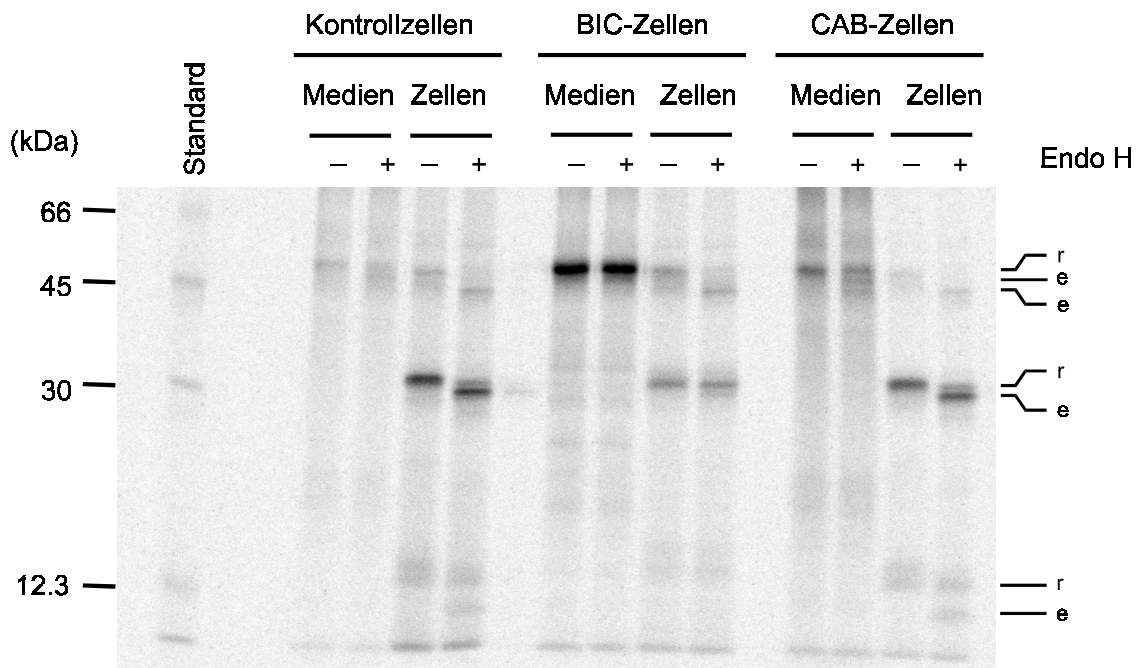
	30 min		2 h		4 h		24 h	
	Me	Ze	Me	Ze	Me	Ze	Me	Ze
Precursor	9 %	91 %	48 %	35 %	70 %	5 %	74 %	-
Intermediat	-	-	-	17 %	-	25 %	-	-
Reife Form	-	-	-	-	-	-	-	26 %

**Tabelle 9:** Verteilung und Prozessierung von Cathepsin D bei BIC-Testzellen zu vier Chase-Zeiten nach zweistündigem Pulse. Bei der Berechnung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen.

Laut Pulse-Chase-Versuch beträgt die lysosomale Sortierung von Cathepsin D 26 %. Das ist geringfügig mehr als zuvor berechnet (siehe Tabelle 5).

### 3.4.1. Oligosaccharidanalysen

Endoglycosidase H spaltet vorwiegend N-Glycane vom mannosereichen Typ. Cathepsin D wurde aus Medien und Zellextrakt immunpräzipitiert und einem Endo H-Verdau unterworfen, um die jeweiligen Anteile an komplexen und mannosereichen Zuckerseitenketten von Cathepsin D nach seiner Sortierung zu ermitteln. Das Verhältnis von komplexen zu mannosereichen Oligosacchariden soll Auskunft über die M-6-P-Abhängigkeit des Transportes sowie über das Maß der gesamten intrazellulären Phosphorylierung geben.



**Abbildung 17:** Oligosaccharidanalysen mittels EndoH-Verdau von Cathepsin D

Im subkonfluenten Stadium wurden alle drei Zellreihen mit je 40  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-Cys/Meth metabolisch markiert. Nach 24 h wurde aus Zellhomogenat und Medium jeweils Cathepsin D immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden geteilt und jeweils eine Hälfte mit Endoglycosidase H für 24 h inkubiert. Die behandelten und unbehandelten Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Expositionszeit betrug 260 h.

"r" bedeutet Endo H resistent, "e" bedeutet Endo H empfindlich.

Die mit Endo H behandelten Kontrollzellen zeigen auf Höhe der schweren Kette von Cathepsin D deutlich eine doppelt konfigurierte Bande. Der obere Anteil der Doppelbande entspricht dem Cathepsin D mit komplexen Oligosaccharid-Seitenketten, der untere Anteil dem mit den mannosereichen. Diese werden nach Verdau durch Endo H leichter, wandern im elektrischen Feld des SDS-Gels also weiter. Setzt man die Intensität der oberen Bande in Beziehung zur Gesamtintensität beider Einzelbanden, so läßt sich der Anteil an Endo H-resistentem, also komplex bezuckertem Cathepsin D ermitteln. Die Quantifizierung der Banden ergab für die Kontrollzellen einen Anteil an Endo H-resistenter schwerer Kette von Cathepsin D von 24 % (Tabelle 10).

Die Testzelle CAB zeigt ein sehr ähnliches Muster. Hier ergab die Quantifizierung einen Anteil an Endo H-resistentem Cathepsin D von 23 % (Tabelle 10).

Die Testzelle BIC zeigt nach Endo H-Behandlung auf Höhe der schweren Kette von Cathepsin D ebenso eine Doppelbande, wobei die untere jedoch vergleichsweise

schwächer ist. Die Quantifizierung ergab einen Anteil von 78 % an Endo H-resistentem Cathepsin D, also gut dreiviertel lysosomalen Enzyms mit komplexen Oligosaccharid-Seitenketten. Bei genauer Betrachtung mag man unmittelbar über der Bande des unbehandelten reifen Cathepsin D noch eine zusätzliche, jedoch schwächere Bande erkennen, wie bei Mukopolidose-Zellen schon früher beschrieben wurde (Hasilik et al., 1981). Sie wird offensichtlich nach Endo H-Behandlung ebenfalls schwächer. Unter Berücksichtigung auch dieser Bande korrigiert sich die Endo H-Resistenz der schweren Kette geringfügig auf 76 % (Tabelle 10). Der hohe Anteil an komplex bezuckertem intrazellulärem Cathepsin D bei den BIC-Fibroblasten kann nicht phosphoryliert worden sein, stellt die Phosphorylierung ja gerade ein Hindernis für die weitere Modifizierung der mannosereichen Oligosaccharid-Seitenketten zur komplexen Form dar. Demnach muß bei BIC-Fibroblasten 76 % des in den Lysosomen befindlichen Cathepsin D M-6-P-unabhängig transportiert worden sein. Bei Kontrollzellen und CAB-Fibroblasten betrugen die Raten 24 %, bzw. 23 %.

#### Reifes Cathepsin D - Schwere Kette:

	Endo H- resistentes Cathepsin D	Endo H- empfindliches Cathepsin D
Kontrolle	24 %	76 %
BIC-Zellen	76 %	24 %
CAB-Zellen	23 %	77 %

**Tabelle 10 :** Anteile an komplexen und mannose-reichen Oligosacchariden der schweren Kette von lysosomal sortiertem reifen Cathepsin D. Bei der Berechnung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Die Zahlen stellen Mittelwerte aus zwei Versuchsdurchgängen dar.

Bei den Kontrollzellen unterliegen die Oligosaccharide der leichten Kette von Cathepsin D auch der Spaltung durch Endo H (zu 38 %), jedoch in geringerem Maß als die der schweren Kette (Tabellen 10 und 11), ein Phänomen, was für Fibroblasten schon beschrieben wurde und auf der schwächeren Phosphorylierung der leichten Kette gegenüber der schweren Kette beruht (Cantor et al., 1992 a,b).

Ähnliches gilt für die CAB-Testzellen (51 % Endo H-Empfindlichkeit, Tabelle 11).

Die BIC-Testzelle zeigt jedoch ein anderes Verhalten. Hier sind die Oligosaccharide der leichten Kette von Cathepsin D, ähnlich wie die der schweren Kette überwiegend Endo H-resistent (83 %, Tabelle 11); ein Zeichen für schwache intrazelluläre Gesamt-Phosphorylierung.

Endo H-resistentes Cathepsin D findet sich normalerweise bei 13 kDa, Endo H-empfindliches bei 14 kDa (vor Behandlung) und bei 12 kDa (nach Behandlung), (Hasilik und von Figura, 1981).

Reifes Cathepsin D - Leichte Kette:

	Endo H- resistentes Cathepsin D	Endo H- empfindliches Cathepsin D
Kontrolle	62 %	38 %
BIC-Zellen	83 %	17 %
CAB-Zellen	49 %	51 %

**Tabelle 11:** Anteile an komplexen und mannose-reichen Oligosacchariden der leichten Kette von lysosomal sortiertem reifen Cathepsin D. Bei der Berechnung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Die Zahlen stellen Mittelwerte aus zwei Messungen dar.

Bei Normalfibroblasten liegt der intrazelluläre Precursor nach Endo H-Behandlung offensichtlich überwiegend als 49 kDa schwere Form vor (Abbildung 17, nicht quantifiziert). Demnach verfügen die meisten Precursor-Moleküle über zwei mannose-reiche Oligosaccharidketten (Hasilik, von Figura, 1981). Den gleichen Befund zeigen sowohl die CAB-Fibroblasten, als auch die BIC-Fibroblasten.

Unterschiede ergeben sich bei der Analyse des Precursors aus den Medien. Kontrollfibroblasten und CAB-Testzellen zeigen hier nämlich nach Endo H-Einwirkung Banden von 53 kDa, 51 kDa und 49 kDa. Dieser Befund spricht für das gleichzeitige Vorliegen von Molekülen mit zweifach komplexen, zweifach mannosereichen Oligosacchariden und Molekülen, bei denen beide Oligosaccharide vorhanden sind (Hasilik, von Figura, 1981). Berücksichtigt man die unterschiedliche Bezuckerung der drei Cathepsin D-Precursor-Banden, so berechnet sich für die Kontrollzellen ein Gesamtanteil an mannosereich Oligosacchariden von 47 %, bei CAB-Zellen von 41 % (Tabelle 12).

BIC-Testzellen dagegen sezernieren Cathepsin D - Precursor - Moleküle, die lediglich zu 5 % mannosereich bezuckert sind (Tabelle 12).

Cathepsin D - Precursor im Medium:

	Endo H- resistentes Cathepsin D	Endo H- empfindliches Cathepsin D
Kontrolle	53 %	47 %
BIC-Zellen	95 %	5 %
CAB-Zellen	59 %	41 %

**Tabelle 12:** Anteile an komplexen und mannose-reichen Oligosacchariden des Cathepsin D - Precursors im Medium. Bei der Berechnung der Banden wurde jeweils ein Backgroundwert abgezogen. Die Zahlen stellen Mittelwerte aus zwei Messungen dar.

Aus Abbildung 17 gehen noch weitere Befunde hervor. Quantifiziert man die Banden von unbehandeltem Cathepsin D aus Zellen und Medien jeder der drei Zelllinien, und berechnet man das Maß der lysosomalen Sortierung von Cathepsin D (wie in den Kapiteln 3.2.1.-3.2.3.), so ergeben sich folgende Werte:

BIC-Fibroblasten: 22 %

CAB-Fibroblasten: 78 %

Kontrollfibroblasten: 88 %.

Die Werte sowohl der BIC-, als auch der CAB-Fibroblasten variieren leicht gegenüber den vormaligen Messungen, die der Kontrollfibroblasten sind identisch.

### 3.4.2. Phosphorylierung von Cathepsin D

Wenn man (gemäß Abbildung 17) den Gesamtanteil des Endo H empfindlichen Cathepsin D nach seiner Sortierung berechnet, dann erhält man das Maß für die maximal mögliche intrazelluläre Phosphorylierung (maximal deshalb, weil ein geringfügiger Teil der mannosereichen Oligosaccharide der Phosphorylierung entgeht und auch nicht zur komplexen Form weitergetrimmt wird, Prof. Hasilik: mündliche Information). Dabei muß die intrazelluläre reife Form (wobei leichte und schwere Kette anteilmäßig gleich behandelt werden), sowie der extrazelluläre Precursor berücksichtigt werden. Der intrazelluläre Precursor ist noch nicht sortiert, das Intermediat kaum vertreten (analog zur Berechnung der lysosomalen Sortierung, Kapitel 3.2.1.-3.2.3.).

Kontrollzellen sortieren Cathepsin D zu 88 % in die Lysosomen (Tabelle 3), dessen Oligosaccharidseitenketten sind zu 76 %, bzw. 38 % mannosereich (Tabellen 10 und 11). Der sezernierte Precursor ist zu 47 % mannosereich (Tabelle 12). Das entspricht



einer gesamten maximal möglichen Cathepsin D-Phosphorylierung in Kontrollzellen von 57 % (Tabelle 13).

Die BIC-Testfibroblasten sortieren 23% (Tabelle 14) des Cathepsin D in die Lysosomen. Dessen Oligosaccharidseitenketten sind zu 24 %, bzw. 17% Endo H-empfindlich (Tabellen 10 und 11). Die der 83 % des sezernierten Cathepsin D sind zu 5 % Endo H-empfindlich (Tabelle 12).

Das entspricht einer gesamten maximal möglichen Cathepsin D-Phosphorylierung in BIC-Fibroblasten von 8 %, was deutlich geringer ist als bei den Kontrollzellen (Tabelle 13).

Bei CAB-Fibroblasten wird 73 % des gesamten Cathepsin D wird in die Lysosomen sortiert (Tabelle 14), dessen Oligosaccharidseitenketten zu 77 %, bzw. 51 % Endo H-empfindlich sind (Tabellen 10 und 11). Sezerniertes Cathepsin D verfügt über 41 % Endo H-empfindliche Oligosaccharidseitenketten (Tabelle 12). Das entspricht einer gesamten maximal möglichen intrazellulären Phosphorylierung in CAB-Fibroblasten von 58 %, was der in Kontrollzellen gemessenen sehr nahe kommt (Tabelle 13).

Maximal mögliche intrazelluläre Phosphorylierung:

Intrazelluläre Phosphorylierung	
Kontrollfibroblasten	57 %
BIC-Fibroblasten	8 %
CAB-Fibroblasten	58 %

**Tabelle 13:** Maximal mögliche intrazelluläre Phosphorylierung von Cathepsin D in kultivierten BIC-Fibroblasten.

### 3.5. Überblick: Cathepsin D-Sortierung

Kontrollzellen sortieren 88 % des neu synthetisierten Cathepsin D in die Lysosomen. Davon sind 24 % Endo H-resistent. Also entspricht der Anteil von Cathepsin D, welcher komplex bezuckert ist und in die Lysosomen gelangt, 21 % vom Gesamt-Cathepsin D. Für BIC-Fibroblasten und für CAB-Fibroblasten berechnet sich jeweils ein von Wert von 17 %. Diesen Zahlen gegenübergestellt werden die bereits berechneten Raten der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -insensitiven Sortierung (Tabelle 14).

Die folgende Tabelle faßt die erhobenen Daten zusammen:

	Lysosomal sortiertes Cathepsin D	Anteil komplexer Oligosaccharide von sortiertem Cathepsin D	Anteil des sortierten, komplex bezugerten CD am Gesamt CD	NH <sub>4</sub> Cl- insensitiv sortiertes Cathepsin D
Kontrolle	88 %	24 %	21%	15 %
BIC-Zellen	23 % *	76 %	17%	15 %
CAB-Zellen	73 % **	23 %	17 %	12 %

**Tabelle 14:** Übersicht über das Sortierungsverhalten der zu testenden Zellen bezüglich Cathepsin D im Vergleich zu Kontrollfibroblasten. Der mit \* gekennzeichnete Wert ist ein Mittelwert aus den Über-Nacht-Markierungen, der Pulse-Chase-Markierung und des Endo H-Versuchs. Der mit \*\* gekennzeichnete Wert ist ein Mittelwert aus Über-Nacht-Markierung und Endo H-Versuch. CD bedeutet Cathepsin D.

Damit ist jede Zellreihe bezüglich zwei verschiedener Merkmale charakterisiert worden, aufgrund derer das Maß der Mannose 6-Phosphat unabhängigen Sortierung beurteilt werden soll. Erstens bezüglich Rest-Sortierung von Cathepsin D in Anwesenheit von NH<sub>4</sub>Cl, und zweitens bezüglich Endo H-Resistenz der Oligosaccharidseitenketten von sortiertem Cathepsin D.

### 3.6. Enzymassays

Um neben der Zielsteuerung von Cathepsin D auch die eines anderen lysosomalen Markerenzym in den zu testenden Zellen zu studieren, wurde aus Zellextrakten und Medien kultivierter Zellen im Vergleich zu Kontrollfibroblasten die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase gemessen.

Dabei wurde die gemessene Aktivität jeweils auf 100000 Zellen bezogen.

**$\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität (mU / 100000 Zellen):**

	Medien	Zellen
BIC-Zellen	2.7 (= 93 %)	0.2 (= 7 %)
CAB-Zellen	1.8 (= 66 %)	0.9 (= 33 %)
Kontrolle	1.8 (= 55 %)	1.5 (= 45 %)

**Tabelle 15:**  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäten aus Zellextrakt und Medium (Mittelwerte aus jeweils drei Messungen).

Die Zellen wurden auf Miniplatten kultiviert und jeweils nach einer Wachstumsphase von 3 Tagen im konfluenten Stadium geerntet und homogenisiert. Die gemessenen Aktivitäten aus den Medien beziehen sich auf jeweils 5 ml Gesamtmedium und 100000 Zellen. Sie wurden um einen Leerwert der im MEM-Medium (+ 10% v/v FKS) gemessenen Aktivität korrigiert. Die Werte der gemessenen Aktivitäten aus den Zellen beziehen sich auf jeweils 100000 Zellen.

### 3.6.1. Kontrollfibroblasten

Kontrollfibroblasten zeigen einen intrazellulären Anteil von 45 %, gegenüber 55 % von im Medium gemessener  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität (Tabelle 15).

### 3.6.2. BIC-Fibroblasten

Einen deutlich anderen Befund gegenüber den Kontrollen zeigen die BIC-Fibroblasten, sowohl in ihren absoluten Werten, als auch in den Anteilen ihrer intra- und extrazellulären Fraktionen. Sie weisen ein klares Übergewicht von der im Medium (93 %, bezogen auf die Gesamtaktivität aus Zellen und Medien) gegenüber der intrazellulär (7 %) gemessenen Enzymaktivität auf (Tabelle 15).

### 3.6.3. CAB-Fibroblasten

CAB-Fibroblasten verhalten sich bezüglich intra- und extrazellulärer  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität ähnlich wie die Kontrollzellen (66 % intrazelluläre gegenüber 33 % extrazelluläre Aktivität, Tabelle 15).

Die Enzymassays bestätigen die Resultate der metabolischen Markierungen bezüglich Sortierung lysosomaler Enzyme. Die  $\beta$ -Hexosaminidase wird wie Cathepsin D von BIC-Fibroblasten vornehmlich sezerniert.

Die CAB-Fibroblasten zeigen jedoch, analog der Immunpräzipitationen von Cathepsin D, auch bezüglich intra- und extrazellulär gemessener  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivitäten ein den Normalfibroblasten ähnliches Bild.

## 4. Diskussion

### 4.1. Fibroblasten der Zelllinie BIC

Die Fibroblasten der Zelllinie BIC stammten von einer Patientin, deren körperlicher und laborchemischer Befund eindeutig für das Vorliegen einer I-Zell-Krankheit sprach, die geistig jedoch völlig gesund war. Normalerweise sind I-Zell-Kinder geistig stark beeinträchtigt. Einzelfälle, bei denen diese Befundkonstellation auftrat, sind zwar schon beschrieben worden, jedoch ist die biochemische Grundlage dieses ungewöhnlichen Phänotyps noch nicht verstanden (Beck et al. 1995; Chang et al., 1995; Okada et al., 1985). Ein möglicher Erklärungsversuch besteht darin, daß bei diesen Patienten eine verstärkte Nutzung eines M-6-P-unabhängigen Transportes für lysosomale Enzyme angenommen wird, der in einigen Geweben, wie z.B. im ZNS, die Ausprägung des für die I-Zell-Krankheit typischen Phänotyps verhindert. Ob Nervenzellen selbst an der Pathologie des Gehirns bei der I-Zell-Krankheit eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Sie weisen gewöhnlich keine *inclusion bodies* auf (Martin et al., 1975, 1984). Allerdings sind Gliazellen, die wie Fibroblasten mesenchymalen Ursprungs sind, von diesen morphologischen Veränderungen betroffen und könnten für die ZNS-Beteiligung bei der I-Zell-Krankheit verantwortlich sein (Endo et al., 1987; Chang et al., 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit sind Transport und Modifikation lysosomaler Enzyme in Fibroblasten dieser Patientin charakterisiert worden. Sollten sich dabei Hinweise auf verstärkte Nutzung eines alternativen Transportes finden lassen, so kann man vermuten, daß dies auch für andere mesenchymale Zellen, z.B. Gliazellen des ZNS gilt, was erklären könnte, daß diese Patienten geistig gesund blieb. Damit wäre ein erstes Indiz für die klinische Relevanz des M-6-P-unabhängigen Transportes im Rahmen der I-Zell-Krankheit gefunden.

#### 4.1.1. Diagnose und Differentialdiagnose

Gesichert ist das Vorliegen einer Mukopolidose im Falle der Patientin BIC nach den metabolischen Markierungen und den  $\beta$ -Hexosaminidase-Assays, die die gestörte Zielsteuerung lysosomaler Enzyme eindeutig belegen. Cathepsin D wurde im Durchschnitt lediglich zu 23 % lysosomal segregiert, der Rest wurde sezerniert. Bei Kontrollzellen betrug die lysosomale Sortierung immerhin 88 % (Tabelle 14). Die Verteilung der Aktivität eines anderen lysosomalen Markerenzym, der  $\beta$ -Hexosaminidase kultivierter Zellen bestätigte dies. Bei den BIC-Fibroblasten wurde extrazellulär 93 % der Gesamtaktivität gemessen, bei den Kontrollen waren es lediglich 55 % (Tabelle 15). Die aufgrund der Endo H-Empfindlichkeit von Cathepsin D nach seiner Sortierung berechnete maximale Phosphorylierung der Zuckerseitenketten betrug 8 %, gegenüber 57 % bei den Kontrollen (Tabelle 13). Demnach muß die Aktivität der Phosphotransferase stark eingeschränkt sein.

Zwischen ML II und ML III wird gewöhnlich aufgrund des klinischen Befundes und des Krankheitsverlaufes differenziert (Kornfeld und Sly, 1995). Direkte Messungen der GlcNAc-Phosphotransferase sind kein verlässliches Unterscheidungskriterium. Oft ist zwar die Aktivität in ML II-Fibroblasten nicht messbar, während sie in ML III-Fibroblasten lediglich stark reduziert ist (Hasilik et al., 1981, 1982; Robey und Neufeld, 1982), jedoch gibt es einige Beispiele, wo keine Korrelation zwischen Phosphotransferaseaktivität und klinischer Ausprägung bestand (Okada et al., 1985). Außerdem ist eine direkte Messung der Phosphotransferaseaktivität aufwendig und hätte zu Klärung des ungewöhnlichen Phänotyps nicht beigetragen. Deshalb ist darauf verzichtet worden.

Die vorliegenden biochemischen Befunde lassen keine Unterscheidung zwischen ML II und ML III zu. Erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum aufgrund gestörter Segregation findet man bei beiden Erkrankungen. Mitunter weist die proteolytische Reifung von Cathepsin D Besonderheiten auf. So ist beobachtet worden, daß das Molekulargewicht von reifem Cathepsin D bei der ML II 33 kDa (Hasilik, Neufeld, 1980) betragen kann. Bei der ML III läßt sich mitunter das gleichzeitige Vorliegen einer 33 kDa und einer normal schweren Bande von 31 kDa beobachten (Hasilik et al., 1981).

Doch dies trifft auf die vorliegenden Fibroblasten nicht zu. Die gelelektrophoretische Auftrennung von Cathepsin D zeigt reifes Cathepsin D auf gleicher Höhe wie in den Kontrollen (Abbildung 17). Die dort vermutete schwache zweite Bande läßt eine exakte Zuordnung zu einem der beschriebenen Typen nicht zu. Klinisch kommt aufgrund des starken körperlichen Befundes eine ML III nicht in Frage.

Es muß also aus dem klinischen Befund der Patientin geschlossen werden, daß es sich bei ihr um einen der seltenen, biochemisch noch nicht verstandenen Fälle von I-Zell-Krankheit handelt, bei der im ZNS keine Ausprägung von Symptomen stattgefunden hat.

#### **4.1.2. Mannose-6-Phosphat-unabhängige Segregation**

Die Ergebnisse der Markierungsversuche in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  belegen das gleichzeitige Vorliegen von M-6-P-abhängigen und -unabhängigen Sortierungsmechanismen für Cathepsin D sowohl in BIC-Fibroblasten, als auch in Kontrollzellen. BIC-Fibroblasten sortierten in Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , wie die Kontrollen, noch 15% (Tabelle 14). Die starke Verminderung der gesamten lysosomalen Sortierung in BIC-Zellen bei gleich hohem Anteil an  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -insensitiver Sortierung wie bei den Kontrollen, spricht für starke Einschränkung des M-6-P-abhängigen Transports in BIC-Zellen und normale Ausprägung des alternativen.

Das Ausmaß der M-6-P-unabhängigen Sortierung wurde auch anhand der Oligosaccharidstruktur von sortiertem Cathepsin D überprüft. Aus den Versuchen mit Endo H geht hervor, daß die schwere Kette über 76 % komplexe und 24 % mannosereiche Oligosaccharide verfügt. Bei den Kontrollzellen ist das Verhältnis umgekehrt. Berechnet man, wie hoch der Anteil der komplex bezuckerten schweren Kette am gesamten neusynthetisierten Cathepsin D ist, so ergibt sich für die Kontrollen ein Wert von 21 %, und für die BIC-Zellen von 17 %. Die Befunde der schweren Kette allein charakterisieren den Transport jedoch noch nicht ausreichend. Die schwere und leichte Kette von Cathepsin D können beide auch über ein an der jeweils anderen Kette befindliches Sortierungssignal segregiert werden. Die leichte Kette ist in BIC-Zellen nur

zu 17 % mannosereich bezuckert, gegenüber 38 % in Kontrollzellen. Man könnte daraus schließen, daß die BIC-Zellen anteilmäßig wesentlich weniger Moleküle der komplex bezuckerten schweren Kette im ``Co-Transport`` mit der mannosereichen leichten Kette sortieren können, als die Kontrollen; so daß bei den BIC-Zellen aufgrund der ungefähr gleich hohen Gesamtsortierung die Rate an M-6-P-unabhängiger Sortierung folglich höher sein muß. Diese Überlegung wird jedoch dadurch entkräftigt, daß eben jener Teil an mannosereichen Ketten, der in den Kontrollen im Sinne eines ``Co-Transportes`` die komplex bezuckerten Ketten mitsortiert, in Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sezerniert werden müsste. Die Rate der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -insensitiven lysosomalen Sortierung ist bei den Kontrollzellen jedoch nicht niedriger als bei den BIC-Zellen, sondern sie beträgt in beiden Fällen jeweils 15 %. Die komplex bezuckerten leichten Ketten werden in BIC-Zellen offenbar nicht stärker im ``Co-Transport`` sortiert als in Kontrollzellen. M-6-P-unabhängige Mechanismen scheinen also in beiden Zellen gleich stark vertreten zu sein. Die Befunde der lysosomalen Sortierung von Cathepsin D in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , sowie die Charakterisierung der Oligosaccharidseitenketten von sortiertem Cathepsin D belegen also zwar die Nutzung eines M-6-P-unabhängigen Transportes lysosomaler Enzyme in BIC-Fibroblasten, jedoch fand sich kein Hinweis, daß dieser alternative Transport in stärkerem Maße genutzt wird, als in Kontrollfibroblasten. Die Untersuchung dieses ungewöhnlichen Phänotyps auf verstärkte Nutzung eines alternativen Transportes lysosomaler Enzyme in Fibroblasten ergab keinen Unterschied zu den Kontrollen. Die Ursache für die geistige Unversehrtheit der Patientin bleibt weiterhin unklar. Theoretisch wäre denkbar, daß der alternative Transportmechanismus von verschiedenen Zellen unterschiedlich stark genutzt wird; daß also z.B. Gliazellen stärker von ihm profitieren könnten, als Fibroblasten. Doch dies kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden, muß also Spekulation bleiben. Der Nachweis einer verstärkten Nutzung eines alternativen Transportmechanismus in Fibroblasten hätte selbstverständlich nicht beweisen, sondern lediglich die Hypothese stützen können, daß dieser Transportmechanismus im ZNS die Ausprägung des typischen Phänotyps verhindert. Aber dieser Nachweis hätte Ausgangspunkt für weitere Studien sein können. Z.B. hätte versucht werden können, den alternativen Transportweg auch an Fibroblasten anderer I-Zell-Patienten mit geringgradiger geistiger Beeinträchtigung nachzuweisen. Vielleicht können dies weiterführende Untersuchungen

an Zellen anderer Gewebe, z.B. an Gliazellen, von I-Zell-Patienten mit ähnlichem Phänotyp. Bisher ist der Nachweis nicht erbracht, daß die Ausprägung eines M-6-P-unabhängigen Transportweges lysosomaler Enzyme klinische Relevanz im Rahmen der I-Zell-Krankheit haben kann. M-6-P-unabhängige Sortierung in I-Zell-Fibroblasten ist zwar schon gezeigt worden, jedoch schien das nur die Arylsulfatase A zu betreffen (Waheed et al., 1988). M-6-P-unabhängiger Transport von Cathepsin D in B-Lymphoblasten von I-Zell-Patienten ist gezeigt worden, jedoch ließ sich dieser Befund nicht auf Fibroblasten übertragen (Glickman, Kornfeld, 1993).

Es ist selbstverständlich auch nicht widerlegt worden, daß die Nutzung eines alternativen Transportweges in verschiedenen Geweben von I-Zell-Patienten die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen kann, jedoch liefern die vorliegenden Ergebnisse von Untersuchungen an Patienten-Fibroblasten keinen besonderen Anhalt für die Richtigkeit dieser Hypothese.

## **4.2. Fibroblasten der Zelllinie CAB**

Die Zelllinie CAB stammte von einem frühgeborenen Patienten mit erheblichem neuromuskulären Defizit unklarer Ursache. Das klinische Gesamtbild sprach zwar weniger für das Vorliegen einer Mukopolidose, es waren aber deutlich erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum aufgefallen. Um das Vorliegen einer Mukopolidose zu überprüfen, wurden Fibroblasten des Patienten bezüglich Transport und Modifizierung lysosomaler Enzyme charakterisiert.

### **4.2.1. Differentialdiagnose**

Das für CAB-Fibroblasten berechnete Maß der lysosomalen Sortierung von neu synthetisiertem Cathepsin D liegt im Durchschnitt bei 73 % (Tabelle 14). Dies ist zwar etwas geringer als bei den Kontrollzellen (88 %, Tabelle 14), jedoch wesentlich mehr als



bei den Mukopolidose-Fibroblasten (23 %, Tabelle 14). Die Ergebnisse von Aktivitätsmessungen der  $\beta$ -Hexosaminidase aus Medien und Zellhomogenat kultivierter CAB-Fibroblasten korrelieren gut mit den Befunden der metabolischen Markierungen. Der Anteil von im Medium gemessener Aktivität ist mit 66 % zwar geringfügig höher als bei den Kontrollzellen (55 %), jedoch deutlich niedriger als bei den Mukopolidose-Fibroblasten der Zellreihe BIC (93 %, Tabelle 13). Damit liegt kein signifikanter Hinweis für gestörte M-6-P-abhängige lysosomale Enzymsortierung vor.

Auch die lysosomale Sortierung von Cathepsin D in CAB-Fibroblasten in Anwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zeigt keine signifikante Abweichung von der in Kontrollzellen gemessenen. Die Restsortierung beträgt 12 % gegenüber 15 % bei den Kontrollen (Tabelle 14). Der Anteil an M-6-P-unabhängiger Segregation in Fibroblasten scheint demnach auch unauffällig zu sein.

Über den Anteil an mannosereichen Oligosaccharidseitenketten wurde bei CAB-Fibroblasten das Ausmaß der Phosphorylierung von sortiertem Cathepsin D berechnet. Die Struktur der Oligosaccharidseitenketten bei CAB-Fibroblasten zeigten bei allen Formen des sortierten Cathepsin D wenig Differenz gegenüber den Kontrollzellen (Tabellen 10-12). Für die CAB-Fibroblasten wurde eine maximale Phosphorylierung der Oligosaccharidseitenketten von neu synthetisiertem Cathepsin D von 58 % berechnet, die sich nicht wesentlich von der für die Kontrollen berechneten unterschied (57 %), jedoch deutlich höher war als bei den Mukopolidose-Zellen (8%), (Tabelle 13).

Somit kann im Falle des Patienten CAB zwar aufgrund der biochemischen Untersuchungen das Vorliegen einer Mukopolidose ausgeschlossen werden, jedoch bleibt die exakte Diagnose und damit auch die Ursache der erhöhten Serumwerte lysosomaler Enzyme im Rahmen dieser Arbeit anhand der zur Verfügung stehenden Befunde ungeklärt.

In CAB-Fibroblasten ist die lysosomale Sortierung von Cathepsin D geringfügig niedriger als in Kontrollen. Die  $\beta$ -Hexosaminidase wird geringfügig stärker sezerniert als in Kontrollen. Diese Differenzen werfen die Frage auf, ob die „Sortierungsmaschinerie“ lysosomaler Enzyme nicht an anderer Stelle als an der

Synthetisierung des Sortierungssignals Störungen aufweist. Denkbar wäre, daß bezüglich der Funktionen der M-6-P-Rezeptoren Veränderungen vorliegen, die dazu führen, daß die lysosomale Sortierung nicht optimal ist. Bislang ist beim Menschen kein Syndrom bekannt, welches auf einen Rezeptordefekt zurückzuführen ist. Es ist aber aufgrund von Experimenten an rezeptordefizienten Fibroblasten von Mäuse-Embryos bekannt, daß in vivo der Ausfall keines der beiden Rezeptortypen durch den anderen kompensiert werden kann (Pohlmann et al., 1995; Munier-Lehmann et al., 1996). Weiterführende Studien könnten die Rezeptorfunktionen dieser Fibroblasten untersuchen.

Interessant wäre außerdem, Zellen des Patienten zu untersuchen, die lysosomale Enzyme hauptsächlich M-6-P-unabhängig segregieren, wie zum Beispiel Leukozyten. Sollte ihr Gehalt an lysosomalen Enzymen geringer sein als bei gesunden Kontrollleukozyten, so wäre das ein Hinweis, daß die Erhöhung lysosomaler Enzyme im Serum eventuell auf das Vorliegen eines gestörten alternativen Transportweges zurückzuführen sei, auch wenn sein Anteil in Fibroblasten normal ist. Bisher ist keine Erkrankung bekannt, bei der eine Störung dieses Transportweges ursächlich ist. Der Patient ist inzwischen jedoch nach einigen Lebensmonaten leider verstorben. Es stehen außer den Fibroblasten keine weiteren Zellen oder Blutproben zur Verfügung. Innerhalb der Familie des Kindes gibt es keine ähnlichen Fälle. Es war die erste Geburt der Mutter. Es wäre jedoch denkbar, daß eine eventuelle Störung des alternativen Transportweges vererbt wird und es innerhalb der Familie nicht erkrankte heterozygote Merkmalsträger gibt, bei denen das Ausmaß der Störung des M-6-P-unabhängigen Transportweges nicht ausreicht, um phänotypisch auffällig zu werden. Um das zu überprüfen, müßten aus Serum und Leukozyten von Familienangehörigen des Kindes die lysosomale Enzymaktivität gemessen werden und mit Kontrollseren und -zellen gesunder Probanden verglichen werden. Leider standen Familienangehörige des Patienten für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung.

Differentialdiagnostisch wurde ferner ein CDG-Syndrom (carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome) in Betracht gezogen. Es handelt sich hierbei um einen erst kürzlich entdeckten autosomal-rezessiv vererbten Glykosylierungsdefekt von

Serumglykoproteinen mit asparagingekoppelten Oligosacchariden (Yamashita et al., 1993; Jaeken und Carchon, 1993). Klinisch imponieren vor allem schwere ZNS-Symptome, generalisierte muskuläre Hypotonie und multiple Organveränderungen. Zur Diagnose wird als laborchemischer Parameter insbesondere das Serumprotein Transferrin herangezogen, welches im Erkrankungsfalle über defekte Oligosaccharidseitenketten verfügt. Laut mündlicher Aussage von Herrn PD Dr. Beck konnte das Vorliegen eines CDG-Syndromes jedoch ausgeschlossen werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die I-Zell-Krankheit (Synonym: Mukopolidose II) ist eine seltene lysosomale Speicherkrankheit, bei der aufgrund eines Defektes der UDP:GlcNAC-Phosphotransferase das Mannose-6-Phosphat-Sortierungssignal lysosomaler Enzyme nicht synthetisiert wird. Lysosomale Enzyme werden deswegen vornehmlich sezerniert. Die Erkrankung geht gewöhnlich mit starker körperlicher und geistiger Beeinträchtigung einher.

Im Rahmen dieser Arbeit sind Hautfibroblasten von zwei Patienten bezüglich Transport und Modifizierung lysosomaler Enzyme charakterisiert worden. Bei beiden Patienten waren stark erhöhte Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum gemessen worden. Die erste Patientin trug körperlich alle Merkmale einer I-Zell-Krankheit, war geistig jedoch völlig gesund. Diese ungewöhnliche Befundkonstellation ist zwar in seltenen Fällen schon beschrieben worden, ihre biochemische Grundlage ist jedoch noch nicht verstanden. Ein Erklärungsversuch beruht darauf, daß bei diesen Patienten die verstärkte Nutzung einer Mannose-6-Phosphat-unabhängigen Sortierung lysosomaler Enzyme angenommen wird, die in einigen Geweben, insbesondere im ZNS, die Ausprägung des Phänotyps verhindert. Es sollte untersucht werden, ob sich in kultivierten Fibroblasten der Patientin Hinweise auf eine solche, verstärkte alternative Sortierung lysosomaler Enzyme finden lassen.

Die erhöhten Aktivitäten lysosomaler Enzyme im Serum des zweiten Patienten warf die Frage nach dem Vorliegen einer I-Zell-Krankheit auf, auch wenn der klinische Befund nicht unbedingt dafür sprach. Anhand von Untersuchungen an Fibroblasten des Patienten sollte die Verdachtsdiagnose I-Zell-Krankheit überprüft werden.

Bei beiden Zelllinien wurden im Vergleich zu Kontrollzellen metabolische Markierungen in An- und Abwesenheit von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durchgeführt. Cathepsin D wurde aus Medien und Zellen immunpräzipitiert, bezüglich seiner Oligosaccharidseitenketten analysiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ferner wurden direkte Enzymassays der  $\beta$ -Hexosaminidase aus Zellextrakt und Medien durchgeführt.

Im ersten Fall konnte die Fehlsortierung von Cathepsin D und der  $\beta$ -Hexosaminidase nachgewiesen und anhand der Oligosaccharidanalysen auf mangelnde Phosphorylierung

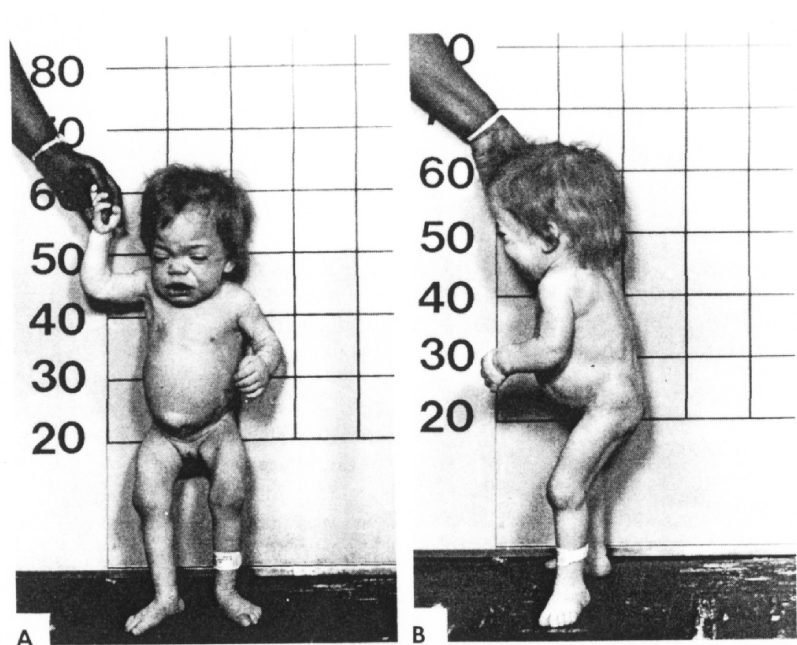
zurückgeführt werden. Somit war das Vorliegen einer I-Zell-Krankheit bestätigt. Ferner ist auch Mannose-6-Phosphat-unabhängige Segregation von Cathepsin D nachgewiesen worden, jedoch war der Anteil mit ca. 15 % der Gesamtsortierung nicht höher als in Kontrollfibroblasten. Somit konnte die Hypothese, daß Mannose-6-Phosphat-unabhängige Segregation die Ausprägung des ungewöhnlichen Phänotyps dieser Mukopolidose-Patientin verursacht, anhand der zur Verfügung stehenden Zellen nicht hinreichend gestützt werden.

Im Falle des zweiten Patienten konnte das Vorliegen einer I-Zell-Krankheit ausgeschlossen werden. Die Segregation von Cathepsin D und  $\beta$ -Hexosaminidase, sowie die Oligosaccharidstruktur von sortiertem Cathepsin D waren regelrecht. Über die Natur des zugrundeliegenden Defektes kann im Rahmen dieser Arbeit nur spekuliert werden.

## 6. Fotos



**Foto 1:** Kultivierter Hautfibroblast eines Patienten mit I-Zell-Krankheit. Man erkennt deutlich die Einschlußkörperchen (inclusion bodies) im Zytoplasma, denen die Krankheit ihren Namen verdankt. (Entnommen aus Scriver et al., *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 1995).



**Foto 2:** I-Zell-Krankheit bei einem 27 Monate alten Kind. Man sieht typische körperliche Merkmale, wie Vergrößerung der Gesichtszüge, Gelenkkontrakturen, Prominenz des Abdomens, Lumbalkyphose und Nabelhernie. Die Diagnose wurde aufgrund klinischer und biochemischer Befunde gestellt. (Entnommen aus Scriver et al., *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 1995).

## 7. Literaturverzeichnis

**Achkar, C.; Gong, Q.; Frankfater, A.; Bajkowski, A.S. (1990)**

Differences in targeting and secretion of cathepsin B and L by BALB/3T3 Fibroblasts and Moloney murine sarkoma virus-transformed BALB/3T3 Fibroblasts.

*J. Biol. Chem.* **265**, 13650-13654

**Aerts, J.M.; Schram, A.W.; Strijland, A.; van-Weely, S.; Jonsson, L.M.; Tager, J.M.; Sorrell, S.H.; Ginns, E.I.; Barranger, J.A.; Murray, G.J. (1988)**

Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation.

*Biochim. Biophys. Acta.* **964**, 303-8

**Bao, M.; Booth, J.L.; Elmendorf, B.J.; Canfield, W.M. (1996a)**

Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Purification and subunit structure.

*J. Biol. Chem.* **271**, 31437-31445

**Bao, M.; Elmendorf, B.J.; Booth, J.L.; Drake, R.R.; Canfield, W.M. (1996b)**

Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Enzymatic characterization and identification of the catalytic subunit.

*J. Biol. Chem.* **271**, 31446-31451

**Baranski, T.J.; Cantor, A.B.; Kornfeld, S. (1992)**

Lysosomal enzyme phosphorylation. I. Protein recognition determinants in both lobes of procathepsin D mediates interaction with UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase.

*J. Biol. Chem.* **267**, 23342-23348

**Baranski, T.J.; Faust, P.L.; Kornfeld, S. (1990)**

Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen.

*Cell* **63**, 281-291

**Baranski, T.J.; Faust, P.L.; Kornfeld, S. (1991)**

Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting.

*J. Biol. Chem.* **266**, 23365-23372

**Baron, R. (1989)**

Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclasts.

*Anat Rec.* **244**, 317-324

**Barrett, A.J. (1979)**

Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase.

*Ciba Found Symp.* **75**, 37-50

**Beck, M.; Barone, R.; Hoffmann, R.; Kratzer, W.; Rakowsky, T.; Nigro, F.; Fiumara, A. (1995)**

Inter- and intrafamilial variability in mucopolidosis II (I-cell disease).

*Clin. Gen.* **47**, 191-199

**Berman, E.R.; Livni, N.; Shapira, E.; Merin, S.; Levij, I.S. (1974)**

Congenital corneal clouding with abnormal systemic storage bodies: A new variant of mucopolidosis.

*J. Pediatr.* **84**, 519-526

**Bradford, M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein dye-binding.

*Anal. Biochem.* **72**, 248-254

**Braulke, T.; Geuze, H.J., Slot, J.W.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987)**

On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells.

*Eur. J. Cell Biol.* **43**, 316-321

**Cantor, A.B.; Kornfeld, S. (1992 a)**

Phosphorylation of Asn-linked oligosaccharides located at novel sites on the lysosomal enzyme cathepsin D.

*J. Biol. Chem.* **267**, 23357-63

**Cantor, A.B.; Baranski, T.J.; Kornfeld, S. (1992 b)**

Lysosomal enzyme phosphorylation. II. Protein recognition determinants in either lobe of procathepsin D are sufficient for phosphorylation of both the amino and carboxyl lobe oligosaccharides.

*J. Biol. Chem.* **267**, 23349-23356

**Capony, F.; Braulke, T.; Rougeot, C.; Roux, S.; Montcourrier, P.; Rochefort, H. (1994)**

Specific mannose 6-phosphat receptor-independant sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells.

*Exp. Cell Res.* **215**, 154-163

**Chang, S.H.; Lin, S.J.; Lee, Y.Y.; Yang, R.C.; Yan, S.L. (1996)**

I-cell disease: report of a case.

*Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* **12**, 295-300



**Conner, G.E. (1989)**

Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography.

*Biochem. J.* **263**, 601-604

**Couso, R.; Lang, L.; Roberts, R.; Kornfeld, S. (1986)**

Phosphorylation of the oligosaccharide of uteroferrin by UDP-GlcNAc-Phosphotransferase from rat liver, A. castellani, and D. discoideum requires  $\alpha$ 1,2-linked mannose residues.

*J. Biol. Chem.* **261**, 6326-6331

**Dahms, N.M.; Wick, D.A.; Brzycki-Wessell, M.A. (1994)**

The bovine mannose 6-phosphate / insulin-like growth factor II receptor. Localization of the insulin-like growth factor II binding site to domains 5-11.

*J. Biol. Chem.* **269**, 3802-3809

**Dawson, G.; Matalon, R.; Dorfman, A. (1972)**

Glycosphingolipids in cultured human skin fibroblasts. Characterization and metabolism in fibroblasts from patients with inborn errors of glycosphingolipid and mucopolysaccharide metabolism.

*J. Biol. Chem.* **247**, 5951-5985

**de Duve, C.; Wattiaux, R. (1966)**

Functions of lysosomes.

*Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435-492

**Diment, S.; Leech, M.S.; Stahl, P.D. (1988)**

Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes.

*J. Biol. Chem.* **263**, 6901-6907

**Duncan, J.R.; Kornfeld, S. (1988)**

Intracellular movement of two mannose-6-phosphate receptors: return to Golgi apparatus.

*J. Cell Biol.* **106**, 617-628

**Endo, H.; Miyazaki, T.; Asano, S.; Sagami, S. (1987)**

Ultrastructural studies of the skin and cultured fibroblasts in I-cell disease.

*J. Cutan. Pathol.* **14**, 309-317

**Farquhar, M.G.; Palade, G.E. (1981)**

The Golgi apparatus - (1954-1981) - from artifact to center stage.

*J. Cell Biol.* **91**, 77-103

**Faust, P.; Kornfeld, S.; Chirgwin, J.M. (1985)**

Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4910-4914

**Forgac, M. (1992)**

Structure and properties of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase.

*J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 341-350

**Gieselmann, V.; Pohlmann, R.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1983)**

Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts.

*J. Cell Biol.* **97**, 1-5

**Glickman, J.N.; Kornfeld, S. (1993)**

Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts.

*J. Cell Biol.* **123**, 99-108

**Goldberg, D.E.; Kornfeld, S. (1983)**

Evidence for extensive subcellular organization of asparagine-linked oligosaccharide processing and lysosomal enzyme phosphorylation.

*J. Biol. Chem.* **258**, 3159-3165

**Gonzalez-Noriega, A.; Grubb, J.H.; Talkad, V.; Sly, W.S. (1980)**

Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal secretion by impairing receptor recycling.

*J. Cell Biol.* **85**, 839-852

**Grässel, S.; Hasilik, A. (1992)**

Human cathepsin D precursor is associated with a 60 kDa glycosylated polypeptide.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 276-282

**Hanewinkel, H.; Glossl, J.; Kresse, H. (1987)**

Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts.

*J. Biol. Chem.* **262**, 12351-12355

**Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980a)**

Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts: synthesis as precursors of higher molecular weight.

*J. Biol. Chem.* **255**, 4937-4945

**Hasilik, A.; Neufeld, E.F. (1980b)**

Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts: phosphorylation of mannose-residues.

*J. Biol. Chem.* **255**, 4946-4950

**Hasilik, A.; Voss, B.; von Figura, K. (1981)**

Transport and processing of lysosomal enzymes by smooth muscle cells and endothelial cells.

*Exp. Cell Res.* **133**, 23-30

**Hasilik, A.; von Figura, K.; Conzelmann, E.; Nehr Korn, H; Sandhoff, K. (1982)**

Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts: activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of  $\beta$ -Hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2.

*Eur. J. Biochem.* **125**, 317-312

**Hasilik, A.; Waheed, A.; von Figura, K. (1981)**

Enzymatic phosphorylation of lysosomal enzymes in presence of UDP-N-Acetylglucosamine. Absence of the activity in I-cell-fibroblasts.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 761-767

**Hasilik, A.; Waheed, A.; Cantz, M.; von Figura, K. (1981)**

Impaired phosphorylation of lysosomal enzymes in fibroblasts of patients with mucopolidosis III.

*Eur. J. Biochem.* **122**, 119-123

**Hasilik, A. (1992)**

The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation.

*Experientia* **48**, 130-151

**Hasilik, A.; von Figura, K. (1981)**

Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and  $\beta$ -hexosaminidase.

*Eur. J. Biochem.* **121**, 125-129

**Hauri, H.P.; Schweizer, A. (1992)**

The endoplasmic-reticulum-Golgi intermediate compartment.

*Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 600-608

**Hieber, V.; Distler, J.; Jourdian, G.W. et al. (1975)**

Accumulation of [35]-S-mucopolysaccharides in cultured mucopolidosis cells.

*Birth Defects* **6**, 307-310

**Hoflack, B.; Kornfeld, S. (1985)**

Purification and characterization of cation-dependent-mannose-6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver.

*J. Biol. Chem.* **260**, 12008-12014

**Hoflack, B.; Fujimoto, K.; Kornfeld, S. (1987)**

The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependant mannose 6-phosphate receptor.

*J. Biol. Chem.* **262**, 123-129

**Honey, N.K.; Mueller, O.T.; Little, L.E.; Shows, T.B. (1982)**

Mucopolidosis III is genetically heterogenous.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7420-7424

**Imort, M.; Zühlendorf, M.; Feige, U.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1983)**

Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes in human monocytes and macrophages.

*Biochem. J.* **214**, 671-678

**Isidoro, C.; Radons, J.; Baccino, F.M.; Hasilik, A. (1990)**

Suppression of the uncovering of mannose-6-phosphate residues in lysosomal enzymes in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

*Eur. J. Biochem.* **191**, 591-597

**Jaeken, J.; Carchon, H. (1993)**

The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. An overview.

*J. Inherit. Metab. Dis.* **16**, 813-820

**Kelley, T.E. et al. (1975)**

Mucopolidosis III: clinical and laboratory studies in a series of 12 patients.

*Johns Hopkins Med. J.* **137**, 156-175

**Kelly, B.A.; Carchmann, R.A. (1987)**

The relationship between lysosomal enzyme release and protein phosphorylation in human monocytes stimulated by phorbol esters and opsonized zymosan.

*J. Biol. Chem.* **267**, 17404-17411

**Klausner, R.D. (1989)**

Sorting and traffic in the central vacuolar system.

*Cell* **57**, 703-706

**Kobata, A. (1979)**

Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates.

*Anal. Biochem.* **100**, 1-14

**Kornfeld, S. (1992)**

Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.

*Annu. Rev. Biochem.* **61**, 307-330

**Kornfeld, S. (1986)**

Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states.

*J. Clin. Invest.* **77**, 1-6

**Kornfeld, S.; Mellman, I. (1989)**

The biogenesis of lysosomes.

*Ann. Rev. Cell. Biol.* **5**, 483-525

**Kornfeld, R.; Kornfeld, S. (1985)**

Assembly of asparagine-linked oligosaccharides.

*Ann. Rev. Biochem.* **54**, 631-664

**Kornfeld, S.; Sly, W.S. (1995)**

I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization.

In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol.II (Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.), 2495-2508, McGraw-Hill, Inc, New York

**Laskey, R.A.; Mills, A.D. (1975)**

Quantitative film detection of <sup>3</sup>H und <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography.

*Eur. J. Biochem.* **56**, 335-341

**Lee, J.K.; Pierce, M. (1995)**

Purification and characterization of human serum N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase.

*Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 413-425

**Leroy, J.G.; De Mars, R.I. (1967)**

Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts.

*Science* **157**, 804-806

**Leroy, J.G.; Ho, M.W.; McBrinn, M.C.; Ziehlke, K.; Jakob, J.; O'Brian, J.S. (1972)**

I-cell disease: biochemical studies.

*Pediatr. Res.* **6**, 752-757

**Malhorta, V.; Serafini, T.; Orci, L.; Shepherd, J.C.; Rothman, J.C. (1989)**

Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the golgi stack.

*Cell* **58**, 329-336

**Maroteaux, P.; Lamy, M. (1966)**

La pseudo-polydystrophy de Hurler.

*Presse Med.* **74**, 2889-2892

**Martin J.J.; Leroy J.G.; Farriaux Fontaine G. (1975)**

I-Cell disease. A report on its pathology.

*Act. Neuropath.* **33**, 285-305

**Martin J.J.; Leroy J.G.; van Eygen M.; Ceuterick C. (1984)**

I-Cell disease. A further report on its pathology.

*Act. Neuropath.* **64**, 234-242

**Mullis, K.G.; Kornfeld, R.H. (1994)**

Characterization and immunolocalization of bovine liver Phosphodiester-glucosaminidase.

*J. Biol. Chem.* **269**, 1718-1726

**Munier-Lehmann, H.; Mauxien, F.; Bauer, U.; Lobel, P.; Hoflack, B. (1996)**  
Re-expression of the Mannose 6-Phosphate Receptors in Receptor-deficient Fibroblasts.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 15166-15174

**Nagashima K.; Sakakibara K.; Endo H.; Konishi Y.; Suzuki Y.; Abe T. (1977)**  
I-Cell disease. Pathological and biochemical studies of an autopsy case.  
*Clin. Pathol. Jpn.* **27**, 251-264

**Oude Elferink, R.P.; Van Doorn-Van Wakeren, J.; Strijland, A.; Reuser, A.J.; Tager, J.M. (1985)**  
Biosynthesis and intracellular transport of alpha-Glucosidase and Cathepsin D in normal and mutant human fibroblasts.  
*Eur. J. Biochem.* **153**, 55-63

**Okada S.; Owada M.; Sakiyama T.; Yutaka T. (1985)**  
I-Cell-disease: clinical studies of 21 Japanese cases.  
*Clin. Gen.* **28**, 207-215

**Owada, M.; Neufeld E. F. (1982)**  
Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of M-6-P recognition? Evidence from I-Cell-disease.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**, 814-820

**Page, T.; Zhao, K.W.; Tao, L.; Miller, A.L. (1996)**  
Purification and characterization of human lymphoblast N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase.  
*Glycobiol.* **6**, 619-626

**Pearse, B.M.F.; Robinson, M.F. (1990)**  
Clathrin, adaptors and sorting.  
*Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 151-171

**Pelham, H.R.B. (1988)**  
Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment.  
*EMBO J.* **7**, 913-918

**Pohlmann, R.; Wendland, M.; Boeker, C.; von Figura, K. (1995)**  
The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 27311-27318

**Radons, J.; Biewusch, U.; Grässel, S.; Geuze, H.J.; Hasilik, A. (1994)**  
Distinctive inhibition of the lysosomal targeting of lysozyme and cathepsin D by drugs affecting pH gradients and protein kinase C.  
*Biochem. J.* **302**, 581-586

**Richo, G.R.; Conner, G.E. (1994)**

Structural requirements of procathepsin D activation and maturation.

*J. Biol. Chem.* **269**, 14806-14812

**Rijnboutt, S.; Aerts, H.M.; Geuze, H.J.; Tager, J.M.; Strous, G.J. (1991a)**

Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells.

*J. Biol. Chem.* **266**, 4862-4868

**Rijnboutt, S.; Kal, A.J.; Geuze, H.J.; Aerts, H.M.; Strous, G.J. (1991b)**

Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells.

*J. Biol. Chem.* **266**, 23586-23592

**Robey, P.G.; Neufeld, E.F. (1982)**

Defective phosphorylation and processing of  $\beta$ -Hexosaminidase by intact cultured fibroblasts from patients with mucopolidosis III.

*Arch. Biochem. Biophys.* **213**, 251-257

**Sahagian, G.G.; Distler, J.; Jourdian, G.W. (1981)**

Characterization of a membrane associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular  $\beta$ -galactosidase.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4289-4293

**Sahagian, G.G.; Neufeld, E.F. (1983)**

Biosynthesis and turnover of the mannose-6-phosphate receptor in cultured chinese hamster ovary cells.

*J. Biol. Chem.* **258**, 7121-7128

**Schmid, S.; Fuchs, R.; Kielian, M.; Helenius, A.; Mellmann, I. (1989)**

Acidification of endosome subpopulations in wild-type chinese hamster ovary cells and temperature-sensitive acidification-defective mutants.

*J. Cell Biol.* **108**, 1291-1300

**Schweizer, A.; Matter, K.; Ketcham, C.M.; Hauri, H.P. (1991)**

The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi.

*J. Cell Biol.* **113**, 45-54

**Scriber, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D (1995)**

The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol.II.

*McGraw-Hill, Inc, New York*

**Sleat, D.E.; Lobel, P. (1997)**

Ligand Binding Specificities of the Two Mannose 6-Phosphate Receptors.

*J. Biol. Chem.* **272**, 731-738

**Smith, E.; Warren, G. (1991)**

The mechanism of receptor-mediated endocytosis.

*Eur. J. Biochem.* **202**, 689-699

**Stein, M.; Braulke, T.; Krentler, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987a)**

46-kDa mannose-6-phosphate-specific receptor: purification, subunit composition, chemical modification.

*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 927-936

**Stein, M.; Braulke, T.; Krentler, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987b)**

46-kDa mannose-6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology.

*Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 413-418

**Tapper, H.; Sundler, R. (1990)**

Role of lysosomal and cytosolic pH in the regulation of macrophage lysosomal enzyme secretion.

*Biochem. J.* **272**, 407-414

**Thomas G.H.; Tiller, G.E.; Reynolds, L.W. et al. (1976)**

Increased levels of sialic acid associated with sialidase deficiency in I-cell disease fibroblasts.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 188-195

**Tong, P.Y.; Kornfeld, S. (1989)**

Ligand interactions of the cation-dependant mannose-6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose-6-phosphat receptor.

*J. Biol. Chem.* **264**, 7970-7975

**Varki, A.; Kornfeld, S. (1981)**

Purification and characterization of rat liver GlcNAc-Phosphodiesterase.

*J. Biol. Chem.* **256**, 9937-9943

**Varki, A.P.; Reitmann, M.L.; Kornfeld, S. (1981)**

Identification of a variant of mucopolipidosis III: a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7773-7777

**von Figura (1977)**

Human  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties.

*Eur. J. Biochem.* **80**, 525-533

**von Figura, K.; Hasilk, A. (1986)**

Lysosomal enzymes and their receptors.

*Ann. Rev. Biochem.* **55**, 167-193



**Waheed, A.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1981)**

Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal  $\alpha$ -N-acetylglucosaminyl-phosphodiesterase.

*J. Biol. Chem.* **256**, 5017-5021

**Waheed, A.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1982)**

UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase: partial purification and characterisation of the rat liver Golgi enzyme.

*J. Biol. Chem.* **257**, 12322-12331

**Waheed, A.; Van Etten, R.L.; Koob, R.; Drenckhan, D. (1988)**

Targeting of phosphomannosyl-deficient arylsulfatase A to lysosomes of I-cell fibroblasts.

*Eur. J. Cell. Biol.* **45**, 262-267

**Whelan, D.T.; Chang, P.L.; Cockshott, P.W. (1991)**

Mucopolidosis II. The clinical, radiological and biochemical features in three cases.

*Am. J. Med. Gen.* **38**, 111-131

**Yamashita, K.; Ideo, H.; Okkura, T.; Fukushima, K.; Yuasa, I.; Ohno, K.; Takeshita, K. (1993)**

Sugar chains of serum transferrin from patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. Evidence of asparagine-N-linked oligosaccharide transfer deficiency.

*J. Biol. Chem.* **268**, 5783-5789

**Zhao, K.W.; Yeh, R.; Miller, A.L. (1992)**

Purification and characterization of human lymphoblast N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase.

*Glycobiol.* **2**, 119-125

**Zhu, Y.; Conner, G.E. (1994)**

Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis.

*J. Biol. Chem.* **269**, 3846-3851

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
BIC	(Eigenname einer Zellreihe)
BON	(Eigenname einer Zellreihe)
BSA	Rinderserumalbumin
BWS	Brustwirbelsäule
CAB	(Eigenname einer Zellreihe)
CDG	Carbohydrate-deficient Glycoprotein
CTG	Cardio-Tokogramm
Cys	Cystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPO	2,5-Diphenyloxazol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EH, Endo H	Endoglycosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Foetales Kälberserum
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
kDa	kilo Dalton
LWS	Lendenwirbelsäule
M-6-P	Mannose 6-Phosphat
Man	Mannose
MEM	modifiziertes Eagle`s Minimum Essential Medium
Meth	Methionin
ML	Mukolipidose
MPR	Mannose 6-Phosphat-Rezeptor

NP40	Nonidet P 40
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	N, N, N, N - Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen / Herren

in Mainz:

Fischer, Huppmann, Loidl

in Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Baum, Engel, Eschenbach, Ganz, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Huffmann, Kern, Kleinsasser, Klenk, Kraus, Krieg, Lennartz, Lührmann, Netter, Pohlen, Prinz, Riedmiller, Schulz, Thomas, Vogt, Zelder

in Kassel:

Köhler, Neuhaus, Pausch

in Bern:

Ganz

### **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. A. Hasilik, der mir durch seine hervorragende und engagierte Betreuung diese Arbeit ermöglicht hat und darüber hinaus mein Interesse an Forschung und wissenschaftlichem Arbeiten geweckt hat.

Für die sehr engagierte Anleitung und Einführung in Methoden und Arbeitsweisen im Labor danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Ute Künzel und den Herren Dr. Hans-Wilhelm Grosch und Dr. Ole Diettrich, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn PD Dr. M. Beck von der Universitätsklinik Mainz danke ich für die Bereitstellung der Patientenzellen und die freundliche Beratung beim Schreiben der Arbeit.